

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Получение и изучение биосовместимости перспективных полимерных материалов для тканевой инженерии

УДК 678.8:615.4

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Е.В.	К.Х.Н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Т.Б.	К.Э.Н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Романова С.В.	-		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Пестряков А.Н.	Д.Х.Н.		

Томск – 2021 г.

Планируемые результаты освоения ООП
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»

Код компетенции	Наименование компетенции
Общекультурные (универсальные) компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, вырабатывая командную стратегию для достижения поставленной цели
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языках (-ах), для академического и профессионального взаимодействия
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия
УК(У)-6	Способен определить и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Готовность к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач профессиональной деятельности;
ОПК(У)-2	Готовность руководить коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия;
ОПК(У)-3	Способность к профессиональной эксплуатации современного оборудования и приборов в соответствии с направлением и профилем подготовки
ОПК(У)-4	Готовность к использованию методов математического моделирования материалов и технологических процессов, к теоретическому анализу и экспериментальной проверке теоретических гипотез;
ОПК(У)-5	Готовность к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
Профессиональные компетенции выпускников	
ПК(У)-1	Способность организовывать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок, разрабатывать задания для исполнителей
ПК(У)-2	Готовность к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-3	Способность использовать современные приборы и методики, организовывать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ПК(У)-18	Способность и готовность к созданию новых экспериментальных установок для проведения лабораторных практикумов
ПК(У)-19	Готовность к разработке учебно-методической документации для реализации образовательных программ
ДПК(У)-1	Готовность к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа с учетом требований охраны здоровья и безопасности труда, защиты окружающей среды.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий

Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель ООП

18.04.01 Химическая технология

_____ А.Н. Пестряков

15.03.2021 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Хан Елене Алексеевне

Тема работы:

Получение и изучение биосовместимости перспективных полимерных материалов для тканевой инженерии

Утверждена приказом директора (дата, номер)

№119-23/С

Срок сдачи студентом выполненной работы:

11.06.2021 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</p>	<p><i>Объектами исследования в данной работе являются полимерные биоразлагаемые скаффолды. Исследование проводилось с использованием эмбриональных клеток фибробластов мышей линии 3T3-L1.</i></p>
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов,</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Обзор литературы 2. Объекты исследования 3. Экспериментальная часть 4. Результаты исследования 5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 6. Социальная ответственность

подлежащих разработке; заключение по работе).	7. Заключение
Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей)	

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы (с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Романова С.В., старший преподаватель ООД ШБИП
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Якимова Т.Б., доцент ОСГН
Раздел ВКР на иностранном языке	Кобзева Н.А., доцент ОИЯ
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
3 Экспериментальная часть получения и изучения биосовместимости перспективных полимерных материалов для тканевой инженерии	
3 Experimental section of preparation and biocompatibility studying of promising polymeric materials for tissue engineering	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	15.03.2021 г.
---	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Е.В.	к.х.н.		15.03.2021 г.

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна		15.03.2021 г.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕДИНЕНИЕ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна

Школа	ИИХБМТ	Отделение школы (НОЦ)	
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов, согласно применяемой техники и технологии, в соответствии с рыночными ценами. Оклады в соответствии с окладами сотрудников «НИ ТПУ»
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	- районный коэффициент- 1,3; - накладные расходы – 16%; - норма амортизации 10%.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Общая система налогообложения. Страховые взносы во внебюджетные фонды 30,2%

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Анализ потенциальных потребителей, анализ конкурентных технических решений, оценка готовности проекта к коммерциализации
2. Разработка устава научно-технического проекта	Определение целей и результатов проекта, организационной структуры проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	Формирование плана и графика проекта: - Определение структур работ; - Определение трудоемкости работ; - Разработка диаграммы Ганта. Формирование бюджета затрат проекта.
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	Расчет показателей сравнительной эффективности проекта, интегрального показателя эффективности

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Карта сегментирования рынка
2. Оценочная карта для сравнения конкурентных разработок
3. Матрица SWOT
4. График проведения и бюджет НТИ
5. Сравнительная эффективность разработки

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.03.2021
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Т.Б.	К.Э.Н.		15.03.2021

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна		15.03.2021

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Получение и изучение биосовместимости перспективных полимерных материалов для тканевой инженерии	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<p>Объектами исследования являются скаффолды, изготовленные из полимерных материалов.</p> <p>Рабочей зоной является биологическая лаборатория Научного парка Томского политехнического университета.</p> <p>Область применения – медицина, тканевая инженерия и биотехнология.</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<p>«Трудовой кодекс Российской Федерации» от 30.12.2001 N197-ФЗ (ред. от 01.05.2021);</p> <p>Федеральный закон от 22 июля 2008 г. N123-ФЗ Технический регламент о требованиях пожарной безопасности (ред. от 30.04.2021).</p>
2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	<p>Вредные факторы:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Химические факторы (токсические, раздражающие) • Отсутствие или недостаток естественного света • Превышение уровня шума • Отклонение показателей микроклимата • Повышенная или пониженная температура поверхностей оборудования, нефтепродуктов • Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека <p>Опасные факторы:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Вредные вещества.
3. Экологическая безопасность:	Анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы);

	<p><i>Анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы органических веществ);</i></p> <p><i>Анализ воздействия объекта на литосферу (загрязнение почвы хим. веществами).</i></p>
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	<p><i>Возможные ЧС:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выбросы вредных веществ в окружающую среду); • ЧС, связанная со стихийными бедствиями; <p><i>Наиболее типичная ЧС: пожар техногенного характера</i></p>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.03.2021
---	-------------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Романова С.В.	-		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
Уровень образования магистратура
Период выполнения весенний семестр 2020/2021 учебного года

Форма представления работы:

магистерская диссертация

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы**

Срок сдачи студентом выполненной работы:	11.06.2021 г.
--	---------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
22.03.2021 г.	Разработка раздела «Введение»	10
05.04.2021 г.	Разработка раздела «Обзор литературы»	10
19.04.2021 г.	Разработка раздела «Экспериментальная часть»	10
10.05.2021 г.	Разработка разделов «Результаты исследования».	10
24.05.2021 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
04.06.2021 г.	Оформление ВКР	10
16.06.2021 г.	Представление ВКР	40

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Е.В.	к.х.н.		15.03.2021

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
18.04.01 Химическая технология				
Профессор	Пестряков А.Н.	д.х.н.		15.03.2021

Реферат

Выпускная квалификационная работа включает 108 с., 21 рисунок, 41 таблица, 52 источника.

Ключевые слова: скаффолды, биосовместимость, цитотоксичность, клеточные технологии, *in vitro* исследования, полигидроксибутират, графеновая модификация.

Объектами исследования являются биоразлагаемые полимерные скаффолды, изготовленные методом электроспиннинга.

Цель работы – изготовление и определение биосовместимости скаффолдов на основе полимеров поликапролактон, полигидроксибутират, полигидроксибутират с модификацией восстановленным оксидом графена.

В процессе исследования проводилась модификация скаффолдов для улучшения адгезии и роста клеток, подбор оптимальных условий пассажа клеток и разработка протокола окрашивания для анализа биосовместимости.

В результате исследования получены полимерные скаффолды методом электроспиннинга, показано отсутствие токсического действия на клетки данных полимерных материалов, составлены протоколы по работе с клеточными линиями для детекции их адгезии на биоматериалах, установлено, что наибольшей биосовместимостью обладают полимеры, модифицированные восстановленным оксидом графена.

Область применения: биотехнология, медицина, тканевая инженерия.

Экономическая значимость работы: разработан ресурсоэффективный подход для быстрой скрининговой оценки биосовместимости полимерных материалов.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

PHB - полигидроксибутират

PCL - поликапролактон

GO – оксид графена

rGO – восстановленный оксид графена

СМГ – семейство материалов графена

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

PBS – натрий-фосфатный буфер

DMEM – модификация Дюльбекко среды Игла

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум
бромида

Оглавление

Введение	14
1 Обзор литературы	16
1.1 Роль тканевой инженерии в медицине.....	16
1.3 Определение понятия «скаффолд»	18
1.4 Описание полимерных материалов	19
1.5 Пьезоэлектрический эффект биоматериалов.....	20
1.6 Графеновая модификация.....	23
1.7 Электропрядение	25
1.8 Биосовместимость и клеточные технологии	26
1.9 Методы анализа цитотоксичности	28
1.9.1 Резазуриновый тест	28
1.9.2 МТТ-тест.....	30
2 Объекты исследования	33
2.1 Характеристика биологических объектов.....	33
2.2. Описание полимерных скаффолдов.....	34
3 Экспериментальная часть	35
3.1 Получение скаффолдов	35
3.2 Определение структуры скаффолдов	36
3.3 Пьезоэлектрические свойства полимеров	37
3.4 Анализ угла смачиваемости.....	38
3.5 Оценка токсичности скаффолдов с помощью резазуринового теста	39
3.6 Фиксация и окраска клеток с использованием красителей.....	42
3.7 Флуоресцентная микроскопия	43
4 Результаты исследования.....	45
4.1 Образцы полимерных скаффолдов.....	45
4.2 Сканирующая электронная микроскопия	45
4.3 Контактный угол смачиваемости	47
4.4 Пьезоэлектрические характеристики материалов.....	47
4.4 Влияние токсичности биоматериалов на клетки	48
4.5 Апробация протокола окрашивания клеток на скаффолдах	50
4.6 Подсчет и статистическая обработка полученных данных.....	51
5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	54

5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	54
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	54
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	55
5.1.3 SWOT-анализ.....	58
5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации	61
4.1.5. Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования.....	63
4.1.6 Организационная структура проекта.....	64
5.2 Планирование научно-исследовательских работ.....	65
5.2.1. Структура работ в рамках научного исследования	65
5.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ	66
5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования	66
5.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)	68
Автоклав паровой Tuttnauer 2340 МК.....	70
Центрифуга Sigma 2-6E.....	70
5.3 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования..	74
6 Социальная ответственность.....	77
Введение.....	77
6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности.....	77
6.2 Производственная безопасность	78
6.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов	79
6.2.1.1 Химические (токсические, раздражающие).....	79
6.2.1.2 Отсутствие или недостаток естественного света	81
6.2.1.3 Превышение уровня шума	83
6.2.1.4 Отклонение показателей микроклимата.....	83
6.2.2 Анализ опасных факторов производственной среды	84
6.2.2.1 Повышенная или пониженная температура поверхностей	84
6.2.2.2 Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека.....	85
6.2.3 Обоснование мероприятий по снижению уровней воздействия опасных и вредных факторов на исследователя	86
6.3 Экологическая безопасность.....	87

6.4 Чрезвычайные ситуации	87
6.4.1 Пожаровзрывоопасные факторы	87
6.4.2 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	88
Заключение	90
Список публикаций.....	92
Список использованной литературы.....	93
Приложение А.....	99

Введение

В последние три десятилетия теме регенерации тканей уделяется огромное внимание в области здравоохранения. Ключевой концепцией тканевой инженерии является использование биоматериалов для поддержки роста новых клеток и восстановления тканей человека. Вместо того, чтобы быть «пассивными наблюдателями», данные биоматериалы должны обеспечивать как физическую основу для клеток, так и сигналы, влияющие на их поведение [1].

Дизайн биоматериалов непрерывно эволюционирует в течение последних десятилетий. Биоматериалы могут быть адаптированы под любую форму и применяются для обновления или восстановления функции больных, травмированных или разрушенных тканей в организме человека. Биоматериалы могут быть использованы для изготовления синтетических каркасов, называемых скаффолдами, матрицами или 3D-конструкциями.

Каркасы - это трехмерные пористые твердые структуры, которые способны взаимодействовать с клетками, обеспечивая транспорт газов, питательных веществ и регуляторных факторов. Одним из основным свойств является обеспечение выживания, пролиферации и, в некоторых случаях, дифференциации клеток [2].

Целью магистерской диссертации является определение биосовместимости полимерных скаффолдов с использованием эмбриональных фибробластов мышцы линии 3T3-L1.

Поставленные задачи:

- Изготовление полимерных скаффолдов методом электроспиннинга;
- Оценка цитотоксичности полученных биоматериалов *in vitro* с использованием клеточных культур;
- Изучение биосовместимости исходных и модифицированных полимеров;

- Разработка протокола фиксации и окраски клеток на полимерных скаффолдах.

Областью применения данной темы является биомедицина, химическая технология и материаловедение.

Полимерные скаффолды применяются в качестве тканезамещающих компонентов для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Научная новизна заключается в том, что данная работа впервые демонстрирует исследования цитотоксичность и биосовместимости модифицированных восстановленным оксидом графена скаффолдов на основе полигидроксибутирата, который обладает пьезоэлектрическим эффектом.

1 Обзор литературы

1.1 Роль тканевой инженерии в медицине

Травмы и заболевания могут привести к повреждению и дегенерации тканей в организме человека, что требует лечения для облегчения их восстановления, замены или регенерации. Текущий золотой стандарт лечения - использование аутотрансплантатов (костные трансплантаты, взятые из донорского участка в реципиентный участок во время операции); однако недостатками являются ограниченное количество доноров, длительное время операции, риск заражения донорского участка. Аллотрансплантаты - второй наиболее распространенный подход к костной пластике, при котором костная ткань пересаживается от донора, часто от трупа [3]. По сравнению с аутотрансплантатами, аллотрансплантаты менее дороги, но обладают пониженными остеоиндуктивными свойствами из-за отсутствия клеточного компонента в их составе [4,5]. Аллотрансплантаты, вероятно, будут гистосовместимы, но они могут быть иммуногенными и могут передавать инфекции [6]. В результате наблюдается растущий интерес и многочисленные попытки разработать синтетические кости, заменители трансплантата, для сокращения использования аутотрансплантатов и аллотрансплантатов в хирургических операциях [3].

Первые сообщения о попытках восстановить потерянную или поврежденную кость с использованием лабораторных материалов относятся к началу девятнадцатого века, когда хирурги начали исследовать использование фосфатов кальция в качестве костных трансплантатов. С тех пор имплантаты, используемые для лечения костных дефектов, эволюционировали от имплантатов, предназначенных для замены утраченной кости простым заполнением объема дефекта биологически инертным веществом, до стратегий регенерации функциональной костной ткани с использованием биологически активных (биоактивных) материалов. В последующие годы были введены различные типы материалов, и инженерия костной ткани в

конечном итоге стала независимой областью исследований в 1990-х годах. Сегодня достижения в области синтеза и обработки материалов, а также наше более глубокое понимание биологии и структуры костей открывают новые возможности для разработки все более сложных материалов для инженерии костной ткани [7].

Тканевая инженерия определяется как конвергенция передовых наук о материалах, науках о стволовых клетках, физике, биологии развития и клинической трансляции для регенерации сложных тканей и систем органов. [5] Этот трансдисциплинарный подход основан на сочетании последних достижений, достигнутых в каждой из этих разрозненных областей, с клинической перспективой для разработки высокотрансляционных технологий для регенерации сложных тканей и органов. В этих различных областях передовая наука о материалах и инженерия являются неотъемлемой частью разработки интеллектуальных биоматериалов, которые могут модулировать клеточные функции и использовать врожденный регенеративный потенциал организма [3].

1.2 Инженерия костной ткани

Целью инженерии костной ткани является оптимизация ресурсов инженерии материалов и биологических наук для улучшения регенерации новой кости. Она включает использование биоматериалов для лечения дефектов костей вследствие переломов, остеопороза, остеоартрита, новообразований в виде целых протезов, каркасов, гидрогелей и клеток. Был обнаружен ряд успешных результатов на животных моделях заушных тромбов с использованием биоматериалов и клеток, взятых от первичных взрослых остеобластов до мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Регенерация костей - сложный и комплексный процесс, который инициирует миграцию и рекрутирование клеток-остеопрогениторов, сопровождающихся их пролиферацией, дифференцировкой, образованием матрикса и обновлением костей [8].

Фиксация перелома кости обычно проходит в пять этапов. Сначала идет фаза, в которой клетки покоились на поверхности участков перелома, позже некоторые клетки могут рассасываться в пределах участка расположения. Этот процесс резорбции осуществляется клетками остеокластов. Как правило, реконструкция кости - это процесс, который продолжается всю жизнь. Слабая кость заменяется новой в течение года. В процессе ремоделирования перелом также заживает. В случае, когда образование кости и резорбция кости не уравниваются друг с другом, возникают дефекты кости, например, остеопороз. В основном есть два вида клеток, которые отвечают за формирование костей и их разрушение. Эти клетки называются остеобластами и остеокластами соответственно [9]. Поставка кальция также создает взаимодействие между остеокластами и клетками остеобластов в местах ремоделирования. Начальные фазы процесса ремоделирования кости происходят за недели, а полный процесс ремоделирования - за месяцы. В зависимости от возраста, пола, образа жизни и расположения кости скорость их заживления также различается [10].

1.3 Определение понятия «скаффолд»

Скаффолд - одно из лучших решений для фиксации переломов костей при тяжелых травмах. Скаффолды представляют собой высокопористые трехмерные структуры, сделанные из биоматериалов, которые используются для функциональной и структурной замены или регенерации естественных тканей человеческого тела. Могут быть созданы разной формы, способны имитировать природный внеклеточный матрикс кости и создавать трехмерную (3D) атмосферу, в которой клетки прикрепляются и пролиферируют. Целью каркасов является обеспечение такой активности клеток, как миграция, пролиферация, прикрепление и дифференциация, а также для обеспечения транспортировки кислорода и питательных веществ.

В идеале скаффолд должен иметь следующие характеристики:

- трехмерный и высокопористый с взаимосвязанной сетью пор для роста клеток, потокового транспорта питательных веществ и метаболических отходов;
- биосовместимые и биорезорбируемые с контролируемой скоростью разложения и резорбции, чтобы соответствовать росту клеток и тканей *in vitro* или *in vivo*;
- подходящая химия поверхности для прикрепления, миграции, пролиферации и дифференциации клеток;
- механические свойства, соответствующие свойствам тканей в месте имплантации [1].

1.4 Описание полимерных материалов

Биоматериалы могут быть использованы в качестве имплантатов в виде костных пластин, связок, суставов, швов, интраокулярных линз, сердечных клапанов, сосудистых трансплантатов, зубных имплантатов и медицинских устройств, например, кардиостимуляторы, биосенсоры в зависимости от выбранного состава материала [2].

Синтетические биodeградируемые полимеры могут быть использованы как основной материал для создания скаффолдов. Данные скаффолды находят широкое применение в области тканевой инженерии, так как отвечают вышеприведенным требованиям и имеют специфические свойства, которые позволяют решать различные проблемы регенеративной медицины. Одной из особенностей является деградация полимера с заменой его естественной тканью, произведенной из клеток [4,5]. Более того они легкие, недорогие, механически и электрически прочные, демонстрируют отличную совместимость с другими органическими и неорганическими материалами для разработки multifunctional гибридных систем [11].

Поли (ε-капролактон) (PCL) - это распространенный биоразлагаемый полимер, который используется для получения скаффолдов методом электропрядения. Он имеет относительно хорошие механические свойства и

его можно легко обрабатывать по сравнению с другими широко используемыми биоразлагаемыми материалами такими, как поли(лактид) (PLA) и поли(гликолевая кислота). Однако внутренняя гидрофобность PCL сильно ограничивает его применение в качестве каркаса, поскольку гидрофильность поверхностей каркаса очень важна для клеточного поведения. Адгезивные клетки регулируют сигналы с помощью очаговых адгезий к внеклеточному матриксу, которые влияют на их миграцию и морфологию [12].

Поли (3-гидроксibuтират) (PHB) является наиболее тщательно изученным представителем семейства полигидроксиалканоев и демонстрирует хорошую биосовместимость с клетками надпочечников, остеобластами и эпителиальными клетками, способствует росту клеток благодаря уникальному свойству пьезоэлектричества. Однако его высокая хрупкость и низкая деградация ограничивают его применение [13].

1.5 Пьезоэлектрический эффект биоматериалов

Известно, что электрическая стимуляция / электрическая микросреда влияет на процесс регенерации костей, изменяя клеточный ответ, и имеют решающее значение для поддержания функциональности тканей.

Пьезоэлектрический эффект — это явление возникновения электрической поляризации в ответ на приложенное механическое напряжение в определённых твёрдых материалах (таких как кристаллы, определённая керамика и биологическая материя, такая как кость, ДНК и различные белки). Впервые пьезоэлектричество было открыто в 1880 году, после того, как впервые поняли, что давление, приложенное к кварцу или даже некоторым определённым кристаллам, создаёт электрический заряд в этом материале [14]. Липпманом в 1881 году было предсказано явление обратного пьезоэффекта, которое в этом же году подтвердил Кюри. В таблице 1 представлены некоторые из основных применений пьезоэлектричества [15]:

Таблица 1 — Области применения пьезоэлектричества

Связь и контроль	Промышленность	Здравоохранение	Новые применения
<ul style="list-style-type: none"> • Сотовая связь • Телевидение • Автомобильные радары 	<ul style="list-style-type: none"> • Преобразователи • Датчики • Приводы • Насосы • Мотор 	<ul style="list-style-type: none"> • Преобразователи • Датчики • Приводы • Насосы • Мотор 	<ul style="list-style-type: none"> • Умные конструкции • Высокие датчики смещения • Устройства со смешанным эффектом
<ul style="list-style-type: none"> - Обработка сигнала - Контроль частоты и времени - Корреляторы - Фильтры - Осцилляторы 	<ul style="list-style-type: none"> - Ультразвуковая чистка - Неразрушающая оценка - Датчики уровня жидкости - Подавление вибраций - Датчики высокой температуры - Определение свойств материала - Химические / биологические датчики 	<ul style="list-style-type: none"> - Неинвазивная медицинская диагностика - Подкожные препараты - Наручные часы - Фокусировка / стабилизация / ранжирование - Компьютерная синхронизация / печать / модемы - Зажигание газов («искровой насос») 	<ul style="list-style-type: none"> - Микроэлектромеханические (MEMS) устройства - Микрооптомеханические (MOMC) приборы - Биомиметические приборы - Композитные и функционально классифицированные устройства - Радужные устройства - Акустико-фотонно-электронные приборы

Генерация поверхностных зарядов происходит из-за искажения внутренних диполей, которое возникает вследствие приложенной механической силы. В 1950-х годах явление пьезоэлектричества зафиксировали в различных биологических тканях.

Схема прямого и обратного пьезоэффектов соответственно показана на рисунке 1. Прямой пьезоэффект определяется как эффект появления поляризации под действием механических напряжений, а обратный — при возникновении механической деформации в ответ на электрическое поле. Эти эффекты наблюдаются в материалах, где механическая деформация вызывает образование чистого дипольного момента и последующую поляризацию материала [16].

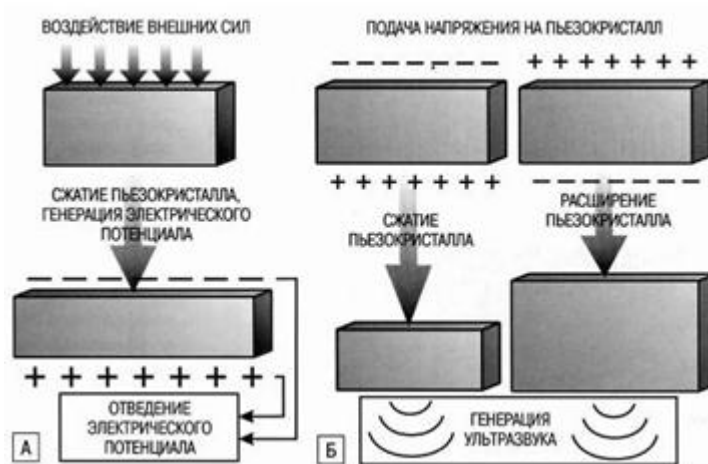


Рисунок 1 Пьезоэлектрический эффект: А. Прямой, Б. Обратный

Явление пьезоэлектричества также можно наблюдать после того, как случайно расположенные диполи по всему материалу будут поляризованы и / или выровнены под действием сильного электрического поля при определенной температуре.

В аморфных диэлектриках, какими являются полимеры, пьезоэлектрический эффект наблюдается в состоянии, когда все молекулы ориентированы вдоль одной оси, то есть материал поляризован. Природные полярные полимерные материалы, обладающие ацентрической структурой, зачастую являются пьезоэлектриками даже без предварительной поляризации, например, древесина, коллаген, натуральный шёлк, дезоксирибонуклеиновая кислота [17].

Таким образом, пьезоэлектрические материалы, благодаря их способности генерировать заряды или потенциалы в ответ на механические

деформации, продемонстрировали большой потенциал для создания умных стимулирующих каркасов для инженерии костной ткани.

1.6 Графеновая модификация

С момента открытия в 2004 году графен и его производные продолжают вызывать интерес во всем мире благодаря своим уникальным характеристикам. Получив Нобелевскую премию по физике всего через шесть лет после своего открытия, этот «чудо-материал» вызвал большие надежды на универсальные приложения, такие как электроника, перенос тепла, автоэлектронная эмиссия, датчики, композиты и энергия. После расширения их применения в биомедицине были предприняты попытки использовать их исключительные свойства для регенерации различных тканей, особенно костей.

Графен - один из аллотропов углерода, который состоит из двумерного листа толщиной в один атом из sp^2 -гибридизованных атомов углерода, плотно упакованных в кольца из шести, образующих сотовую решетку (рисунок 2) [18]. Каждый атом углерода имеет три σ -связи в плоскости, которые отвечают за идеальную планарную природу графена, и одну π -связь вне плоскости, которая может взаимодействовать с соседними атомами. Эта уникальная структура наделила графен исключительными механическими, электрическими, тепловыми и оптическими свойствами, многие из которых превосходят свойства любого другого материала, а некоторые достигают теоретически предсказанных пределов.

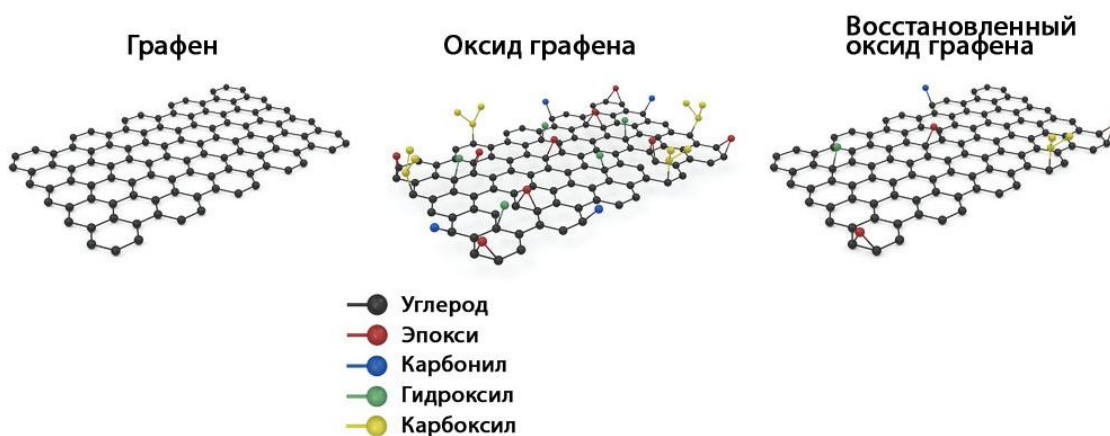


Рисунок 2. Молекулярная структура различных производных семейства материалов графена

Оксид графена (GO) - это окисленная форма графена, которая образуется в результате окисления и расслоения графита в один слой [19]. Лист атомов углерода содержит различные кислородные функциональные группы, которые в основном представляют собой гидроксильные и эпоксидные группы на базовой плоскости, а также меньшего количества карбоксильных, карбонильных, фенольных, лактоновых и хиноновых групп по краям. Кислородные функциональные группы придают гидрофильность гидрофобной структуре графена, что делает GO амфифилом с превосходной диспергируемостью во многих растворителях, включая воду. Они также предоставляют химические мостики, которые позволяют управлять свойствами GO и адаптировать их для различных приложений, что дополнительно открывает широкий спектр возможностей. Однако присутствие этих функциональных групп действует как структурные дефекты в идеальной планарной структуре графена и ставит под угрозу электрические, механические и термические свойства [19].

Другие варианты семейства материалов графена (GFM) включают восстановленный оксид графена (rGO), многослойный графен, графеновые наноленты и различные функционализированные элементы GFM. Эти варианты различаются количеством слоев, химическим составом поверхности, поперечными размерами, чистотой, составом и плотностью дефектов [20].

Например, rGO образуется при обработке GO в восстановительных условиях. Это снижает содержание кислорода и гидрофильность материала, однако частично восстанавливает электропроводность для электрохимических применений.

За последние 7 лет были разработаны различные стратегии использования GFM и их характеристик для производства или модификации биоматериалов с помощью методов, включая смешивание, заливку, химическое или физическое сшивание и покрытие поверхностей. Включение GFM в костные биоматериалы, как правило, приводит к улучшению механических свойств конструкций и биологических характеристик, которые необходимы для образования и регенерации тканей [19]. В нашем исследовании восстановленный оксид графена позволяет улучшить пьезоэлектрические свойства полигидроксibuтирата.

1.7 Электропрядение

Электропрядение - один из наиболее традиционных методов, используемых в тканевой инженерии, основанный на том факте, что электростатические силы могут использоваться для формирования и расширения волокон из раствора или расплава полимера [12]. Инструмент для электропрядения состоит из четырех частей, включая источник напряжения для обеспечения необходимого напряжения на основе эксперимента (обычно 5-50 кВ), шприцевой насос для перекачивания раствора, коллектор другой формы и размера, и металлическая игла, которая подсоединяется к шприцу для полимерного раствора и металлический коллектор.

Процесс электроспиннинга начинается, когда электричество перемещается в раствор от металлической иглы при высоком приложенном напряжении, которое может перемешивать заряды и способствовать индукции заряда раствора полимера. Сильное электростатическое отталкивание зарядов создает силу, противодействующую поверхностному натяжению жидкости, которая вызывает течение жидкости в направлении электрического поля.

Следовательно, сферическая капля жидкости деформируется в конический объект, обычно известный как конус Тейлора на кончике металлической иглы. Эта наэлектризованная струя может затем выполнять этапы растяжения и взбивания, вызывая образование длинных и тонких нитей [21]. Диаметр этих нитей уменьшается с микрометров до десятков нанометров, в значительной степени из-за электростатического отталкивания, испарения растворителя и, как следствие, удлинения струи жидкости. Наконец, на кончике металлической иглы образуются ультратонкие волокна, которые накапливаются на коллекторе. Схематическое устройство оборудования показано на рисунке 3.

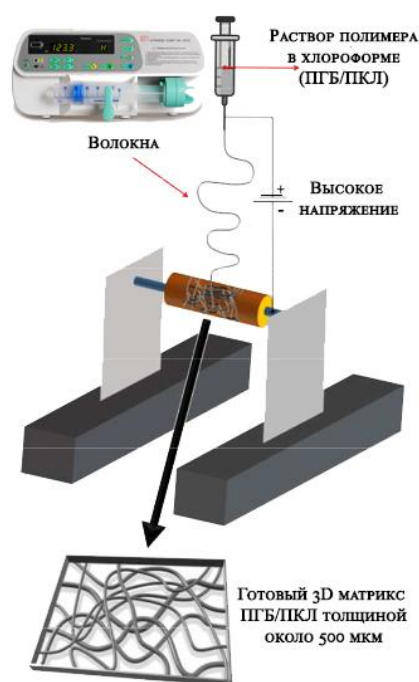


Рисунок 3. Схема установки для электроспиннинга

Морфология, диаметр и пористость полученных волокон и соответствующих мембран представляют особый интерес в контексте разработки каркасов, которые могут обеспечить подходящую среду для регенерации костной ткани [16].

1.8 Биосовместимость и клеточные технологии

Наиболее часто используемый термин для описания соответствующих биологических требований к биоматериалам, используемым в медицинском

устройстве - это биосовместимость [22]. Упрощенное определение биосовместимости заключается в том, что материал не вызывает каких-либо неблагоприятных тканевых реакций и способен существовать в «гармонии» с окружающими тканями. Практический подход заключается в идентификации фундаментальных биологических требований, то есть оценка биологической реакции клеток по отношению к биоматериалам, медицинским устройствам или протезам.

Первоначально необходимо знать компоненты, их количество в медицинском изделии, а также технику его изготовления. Диапазон потенциальных биологических опасностей широк и может включать краткосрочные, долгосрочные или специфические токсические эффекты, которые следует учитывать для каждого материала и медицинского устройства. Однако это не означает, что тестирование на все потенциальные опасности будет необходимым или практичным [23].

Поскольку конечный продукт или медицинские изделия, как правило, должны быть стерилизованы перед процедурой имплантирования, необходимо учитывать влияние стерилизации и методов стерилизации [22]. Стерилизация паром, радиационная стерилизация или стерилизация оксидом этилена могут привести к изменениям поверхностных и объемных свойств материала, и это может иметь потенциальное влияние на биосовместимость.

Наиболее распространенным первым этапом анализа биосовместимости является использование систем клеточных культур для определения цитотоксичности, клеточной адгезии, активации или гибели клеток, то есть метод *in vitro* [23]. В данном типе анализа используется тот тип клеток, для которого исследуемый биоматериал предназначен в условиях клинического применения.

Однако, исследования *in vitro* не доказывают возможность апробации материалов на людях. Биосовместимость в течение длительного времени остается ключевой проблемой для некоторых биоматериалов. Такие факторы,

как преждевременный износ, инфицирование и отторжение имплантатов, рестеноз и т.д. должны быть учтены [9, 11]. Кроме того, было подсчитано, что 80% инфекций в больницах происходят из-за образования бактериальных биопленок на поверхности биоматериалов, имплантатов или хирургических устройств. Эти биопленки имеют до 1000 раз более высокую устойчивость к антимикробным химическим веществам, чем бактерии в планктонной форме. Фактически, несколько методов *in vitro* для тестирования биоматериалов также не в состоянии воспроизвести различные физиологические условия. Организм - это чрезвычайно сложная и динамичная среда, и, естественно, статические тесты *in vitro* не полностью отражают условия *in vivo*. Как только биоматериал вступает в контакт с тканью, возникает каскад реакции на инородное тело [24]. Он начинается с того, что биоматериал взаимодействует с кровью, вызывая адсорбцию белка на поверхности биоматериала, создавая временную матрицу на основе крови. Затем матрица привлекает другие белки, такие как фибрин, образуя сгустки. Впоследствии осажденные белки на биоматериале сигнализируют о миграции иммунных клеток в область имплантата. Это хроническое воспаление опосредуется интерлейкинами, моноцитами, лимфоцитами, и для проявления острого воспаления требуется около 2–3 недель. Затем процесс заживления ран начинается с привлечения к временной матрице различных хемокинов, факторов роста, цитокинов, митогена, макрофагов и т. д.

1.9 Методы анализа цитотоксичности

1.9.1 Резазуриновый тест

Для количественной оценки воздействия стимулирующих или ингибирующих агентов на культивируемые клетки используются разные методы. Оценка таких эффектов путем прямого подсчета клеток вручную, либо частично автоматизированными процедурами, является довольно трудоемкой работой и обычно требует относительно большого количества клеток. Необходимость в более быстрых испытаниях привела к разработке

новых методов анализов. Так, Везельский описал простой колориметрический анализ для измерения пролиферации и активации клеток. Резазуриновый тест основан на внутриклеточном восстановлении резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид) до резорубина жизнеспособными, метаболически активными клетками, используя НАДН (никотинамидадениндинуклеотид восстановленный) и НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный) в качестве источника электронов. Восстановление происходит с помощью митохондриальных или микросомальных ферментов, а также ферментами дыхательной цепи. Реакция указана на рисунке 4. Поглощение света в образцах является результатом биологической, химической, биохимической или физической реакции [25]. Резазурин и резорубин проявляют разные спектральные свойства, то есть максимум поглощения резазурина составляет 605 нм, а резорубина - 573 нм.

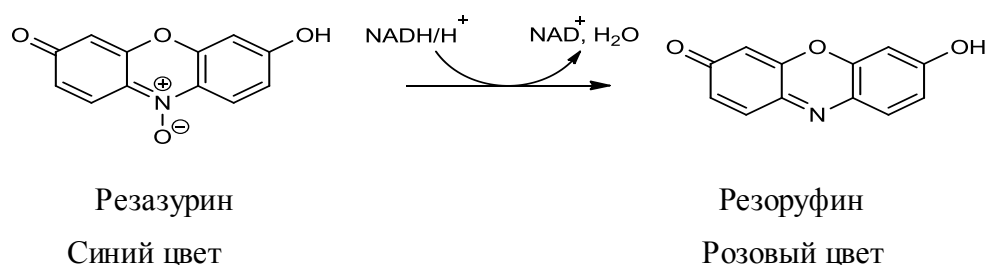


Рисунок 4 Реакция восстановления резазурина до резорубина

Планшетный спектрофотометр измеряет количество образующегося резорубина, которое прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Этот метод получил широкое распространение в научном сообществе благодаря своей точности и скорости при измерении выживаемости и пролиферации клеток [26].

1.9.2 МТТ-тест

МТТ-тест – это калориметрический анализ на основе бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиума, который был открыт в 1983 году Мосманом. Широко используется как второй быстрый и чувствительный метод для скрининга противоопухолевых препаратов, а также для оценки цитотоксичности материалов [27].

Он основан на способности никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) -зависимых клеточных ферментов оксидоредуктазы восстанавливать желтый тетразолиевый краситель МТТ до его нерастворимого формазана, который имеет фиолетовый цвет. Реакция указана на рисунке 5. Этот анализ измеряет жизнеспособность клеток с точки зрения восстановительной активности, то есть количество формазанового продукта, прямо пропорционально живым клеткам. Оптическая плотность окрашенного раствора измеряется при длине волны от 500 до 600 нм.

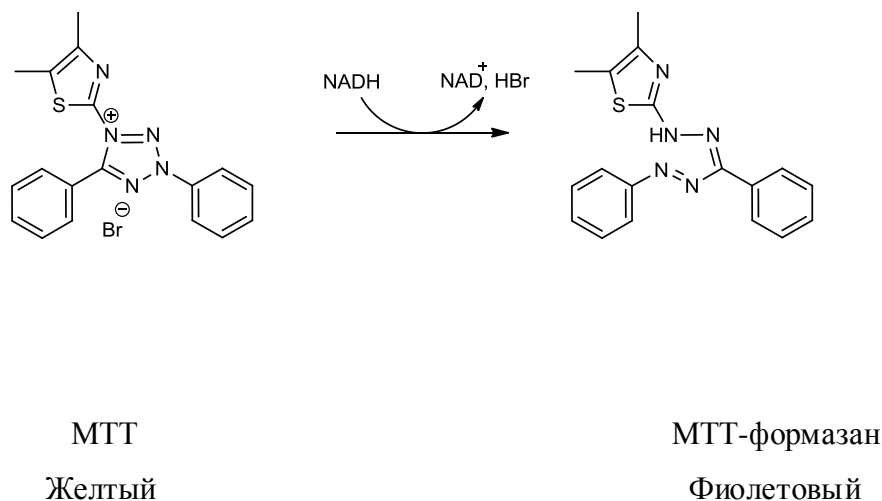


Рисунок 5 Реакция восстановления МТТ до МТТ-формазана

Как и в случае с резазуриновым тестом, было показано, что эндоцитоз МТТ не приводит к явным повреждениям и не вызывает гибели клеток, однако метаболизм и экзоцитоз МТТ могут серьезно повредить клетки [28].

Стоит также отметить, что резазурин восстанавливается более широким спектром ферментов: кроме митохондриальных дегидрогеназ его

восстанавливают также цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки.

Для проведения эксперимента необходимо к суспензии 1000-100000 клеток или клеточному монослою с экстрактом исследуемого образца добавить раствор МТТ (7,5 мг/мл), далее 96-луночный микропланшет инкубируется от 30 минут до 4 часов при 37 ° С, пока внутриклеточные фиолетовые кристаллы формазана не станут видны под микроскопом.

Добавляется 150 мкл раствора для солюбилизации (20% (мас./Об.) додецилсульфата натрия (SDS) в 50% (об./Об.), диметилформамида, доведенный до pH 4,8) в каждую лунку и тщательно перемешивается до растворения темно-синих кристаллов. Необходимо оставить планшет при комнатной температуре в течение 1-2 часов, пока клетки не лизируются и не растворятся фиолетовые кристаллы. Планшеты считываются на ридере microELISA с использованием тестовой длины волны 570 нм и эталонной длины волны 630 нм.

Значение оптической плотности холостого опыта необходимо вычесть из всех образцов. Показания абсорбции исследуемых образцов затем необходимо разделить на показания контроля и умножить на 100, чтобы получить процент жизнеспособности или пролиферации клеток, как указано в формуле 1. Значения поглощения, превышающие контроль, указывают на пролиферацию клеток, тогда как более низкие значения предполагают гибель клеток или ингибирование пролиферации.

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \frac{\Delta|(\text{образца})|}{\Delta|(\text{контроль+})|} \times 100\%, \quad (1)$$

где $\Delta\text{ABS}(\text{образца}) = \text{ABS}_{570}(\text{образца}) - \text{ABS}_{620}(\text{образца})$ – разность между средними значениями оптических плотностей исследуемых образцов при длинах волн 570 нм и 620 нм;

$\Delta\text{ABS}(\text{контроль+}) = \text{ABS}_{570}(\text{контроль+}) - \text{ABS}_{620}(\text{контроль+})$ – разность между средними значениями оптических плотностей контроля живых клеток при длинах волн 570 нм и 620 нм.

Чувствительность МТТ-анализа ниже, чем у флуоресцентных или люминесцентных анализов, особенно с клетками, которые не быстро пролиферируют, или клетками с низкой метаболической активностью. Кроме того, некоторые химические соединения препятствуют восстановлению МТТ до формазана и поэтому не легко совместимы с анализами МТТ. К ним относятся полифенолы, витамин А, кофермент А и DTT (дитиотреитол). Следует также отметить, что как воздействие МТТ, так и образование кристаллов формазана являются цитотоксическими и вызывают повреждающие изменения клеточной морфологии [29].

2 Объекты исследования

2.1 Характеристика биологических объектов

Для определения цитотоксичности полимерных скаффолдов были использованы клетки фибробластов мышей 3T3-L1, которые получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Использование фибробластов обусловлено их «неприхотливостью» к ростовым компонентам питательной среды, также данные клетки не проявляют свойства дифференцировки, то есть не меняют свою форму, размер и функцию в ходе роста. Фибробласты наиболее дешевые и простые клетки для выращивания в лабораторных условиях.

В качестве питательной среды для выращивания клеток используется DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). В состав среды входят компоненты, которые описаны ниже.

Бикарбонат натрия - поддерживает «естественную» буферную систему культуральной среды.

ХЕПЕС представляет собой фосфатную соль с буферной емкостью в пределах 7,2-7,4 pH, феноловый красный (используется как индикатор pH). Также среда содержит неорганические соли, которые поддерживают осмотическое давление в среде и помогают в регуляции мембранного потенциала, обеспечивая среду ионами натрия, калия и кальция. Аминокислоты являются строительным материалом для белков. Особенно важен L-глутамин; обеспечивает азотом НАД, НАДФН и нуклеотиды, являясь вторичным источником энергии для метаболизма клетки.

Большинство сред включают в себя глюкозу и галактозу как источник энергии для клеток.

Наиболее часто используемыми белками и пептидами является альбумин, трансферрин и фибронектин; они особенно важны при бессывороточном культивировании. Альбумин связывает воду, соли, гормоны и витамины и транспортирует их между клетками и тканями. Фибронектин

играет ключевую роль в адгезии клеток. Трансферрин – белок-переносчик железа, обеспечивающий железом клеточную мембрану.

Многие витамины необходимы для клеточного роста и пролиферации. В культуральную среду обычно добавляют рибофлавин, тиамин и биотин.

Факторы роста, цитокины, гормоны добавляются в культуральную среду для пролиферации и активации клеток.

Антибиотики добавляются для предотвращения контаминации культуральной среды бактериями и грибами; однако антибиотики не предотвращают заражение культуральной среды микоплазмой [30].

2.2. Описание полимерных скаффолдов.

Все полимеры растворялись в 5% хлороформе под действием температуры и ультразвука для интенсификации процесса.

Поликапролактон имеет низкую температуру плавления (примерно 60°C) и низкую температуру стеклования (около минус 60°C) [12]. Скаффолды PCL представляют собой нетканый, прочный, волокнистый материал белого цвета. В ходе обработки плохо смачивались. Не обладает свойством пьезоэлектричества и использовался в качестве контроля.

Полимер PNB представляет собой хрупкий материал с температурой плавления 172°C [13]. Каркасы из PNB более тонкие и также имеют белый цвет. Из-за пьезоэлектрического свойства легко электризовался. Добавление восстановленного оксида графена цвет раствора становился черным. При электроспиннинге скаффолды получались серого цвета с черными вкраплениями.

Полимерные скаффолды нарезались в виде дисков толщиной 0,5 мм и диаметром 8 мм для размещения в 96-луночной планшете. Стерилизация проводилась с помощью 70% этанола и промывались в натрий-фосфатном буфере.

3 Экспериментальная часть

3.1 Получение скаффолдов

На первом этапе полимерные порошки растворялись в 5%-ном хлороформе. Концентрации полимеров в растворе составляли: PCL – 9% мас., PNB – 5 % мас. Для интенсификации процесса использовался ультразвук. Растворение выполнялось при температуре 50°C в герметично упакованной банке, помещённой в ультразвуковую ванну на 2-4 часа с периодическим встряхиванием раствора вручную (каждые 30 минут, в первый час каждые 15 минут) до получения гомогенной смеси. Второй этап заключался в заполнении шприца полученным раствором. Далее запускался аппарат для электроспиннинга. По окончании получения материалы снимались с вала коллектора и помещались в сушильный шкаф на 24 часа при температуре 30°C для удаления остатков растворителя. На выходе получали волокнистые полимерные скаффолды.

Пьезоэлектрические свойства различных материалов по-разному зависят от пористости структуры. Усиление пьезоэлектрических свойств с увеличением плотности скаффолда объясняется лучшей взаимосвязью активной пьезоэлектрической фазы.

Для модифицирования PNB был использован диспергированный восстановленный оксид графена в количестве 0,7% от массы сухого полимера. Растворение оксида графена происходило в хлороформе с использованием ультразвука. Далее к раствору добавляли навеску PNB и заправляли в шприц для электроспиннинга.

Полимеры, растворенные в хлороформе, показаны на рисунке 6.

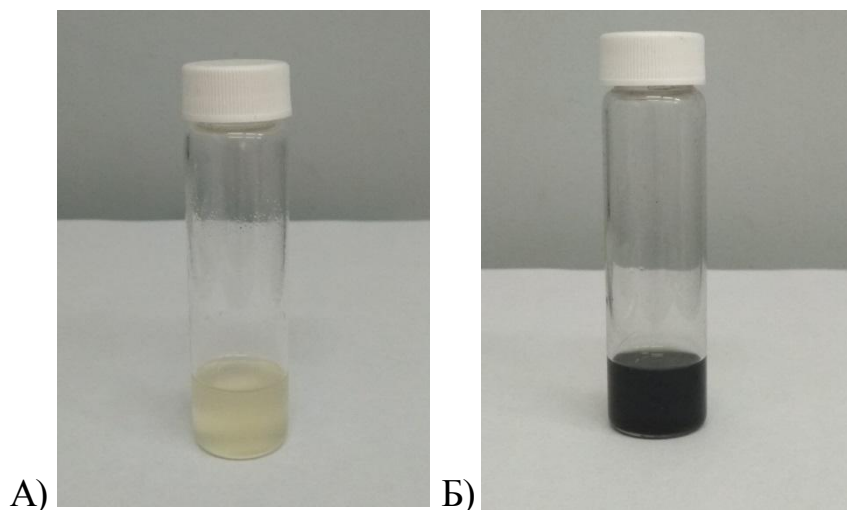


Рисунок 6 Растворы А) РНВ и Б) РНВ в сочетании с rGO

3.2 Определение структуры скаффолдов

Сканирующая электронная микроскопия (SEM) - это инструмент, с помощью которого можно увидеть невидимые миры микропространства и нанопространства. На данный момент исследователям доступны два типа микроскопии: оптическая микроскопия (ОМ) и сканирующая электронная микроскопия (SEM). ОМ отличается от SEM в следующих свойствах и особенностях:

(а) основной принцип работы в ОМ - это свет, в отличие от SEM, параметры которого зависят от электронной эмиссии;

(б) простой ОМ имеет только одну линзу, а составной ОМ - две линзы. Линзы зависят от отклонения света для увеличения изображения;

(с) увеличение современного ОМ достигает диапазона от 400 до 1000 раз по сравнению с исходными размерами, что очень мало по сравнению с увеличением, полученным с помощью SEM, достигает 300000 раз.

Для определения структуры скаффолдов применялся метод сканирующей электронной микроскопии, выполненный на системе с электронными сфокусированными пучками QUANTA 200 3D (FEI Company (США)). ОМ был использован для детекции клеток на скаффолдах.

3.3 Пьезоэлектрические свойства полимеров

С целью оценки пьезоэлектрических свойств были проведены измерения пьезоэлектрических характеристик используемых в работе образцов.

Для определения пьезоэлектрического коэффициента d_{33} был использован пьезотестер YE2730A d_{33} meter (рисунок 7). В данной установке образцы подвергаются циклическому механическому нагружению с силой 250 мН и частотой 110 Гц.



Рисунок 7 Пьезотестер YE2730A d_{33} meter

Пьезоэлектрический потенциал поверхности полученных полимерных скэффолдов исследовался на разработанной в Томском политехническом университете установке, функциональная схема которой представлена на рисунке 8. Образцы размещались между двумя электродами, один из которых неподвижно закреплён, второй, через систему двигатель – муфта – эксцентричный вал – пружина, оказывал механическое давление с регулируемой частотой. Образцы механически деформировались при частоте 5, 7 и 9 Гц. Электрический потенциал с поверхности пьезоэлектрических образцов обрабатывался при помощи системы из повторителя с нагрузочным сопротивлением 1 ГОм и регистрировался осциллографом Актаком АНР – 1002.

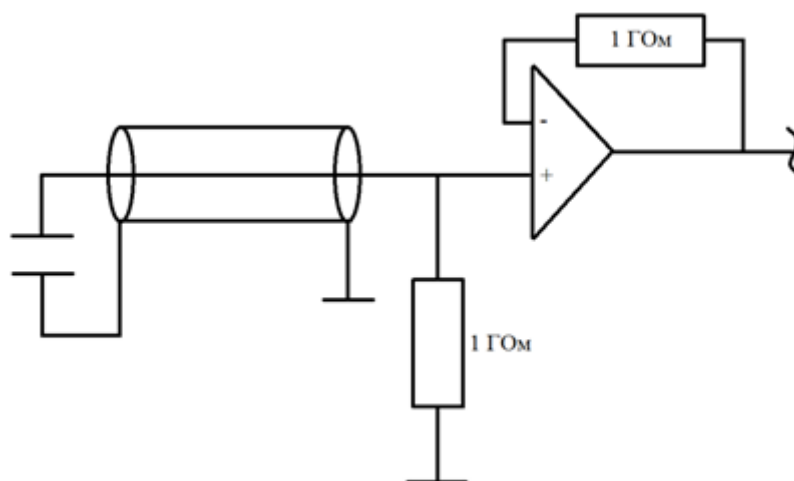


Рисунок 8 Функциональная схема установки для определения
поверхностного потенциала

3.4 Анализ угла смачиваемости

Смачиваемость поверхности образцов скэффолдов определялась путем измерения краевого угла на цифровом углометре Drop Shape Analysis System - DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия) (рисунок 9) методом лежащей капли. Образец в виде полосы 8 x 80 мм помещался в поле зрения видеокамеры прибора перед источником света. При проведении измерения на поверхность подготовленных образцов из системы дозирования подавалась вода в виде капель объемом около 4 - 5 мкл.



Рисунок 9 Углометр Drop Shape Analysis System - DSA100

3.5 Оценка токсичности скаффолдов с помощью резазуринового теста

Готовые полимерные скаффолды PNB, PCL и модифицированный PNB материал с добавлением графеновой модификации были стерилизованы (PNB+rGO) с помощью 70%-ого этилового спирта на шейкере в течение 30-40 минут. Далее каждый образец был по отдельности помещен в пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа). Для получения экстракта добавили 0,7 мл среды DMEM. Поместили экспериментальные пробирки в термостат на 5 суток при 37 °C с подачей CO₂ [31].

Сначала клетки 3T3-L1 были разморожены и культивировались в среде DMEM (с добавлением бычьей сыворотки, глутамина и антибиотиков). После достижения культурой стабильного роста их использовали в эксперименте. В 72 лунки адгезивного 96-луночного планшета внесли по 100 мкл суспензии с 10000 клетками фибробластов мышей 3T3-L1 в среде DMEM, которые были подсчитаны с использованием счетчика клеток Countless II FL. Оставили клетки инкубироваться в термостате на 24 часа при 37 °C с подачей CO₂.

Далее отработанная среда из лунок удалялась, в размеченные лунки, как в таблице 2, вносился экстракт полимерных скаффолдов и среда DMEM. Для отрицательного контроля использовался пероксид водорода 3%, для положительного (живых клеток) контроля - среда DMEM. После суток культивирования был добавлен краситель Alamar Blue (торговое название резазурина).

По истечении 24 часов культивирования с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan Go для УФ-спектроскопии и спектроскопии в видимой области были получены результаты по цитотоксичности полимерных биоматериалов. Оптические плотности суспензий, изображенных на рисунке 10, снятые при 570 нм и при 620 нм, приведены в таблице 3 и 4 соответственно. Данные представлены с учетом вычитания оптической плотности самого планшета.

Оптическая плотность при 570 нм пропорциональна количеству живых клеток, а при 620 – количеству мертвых.

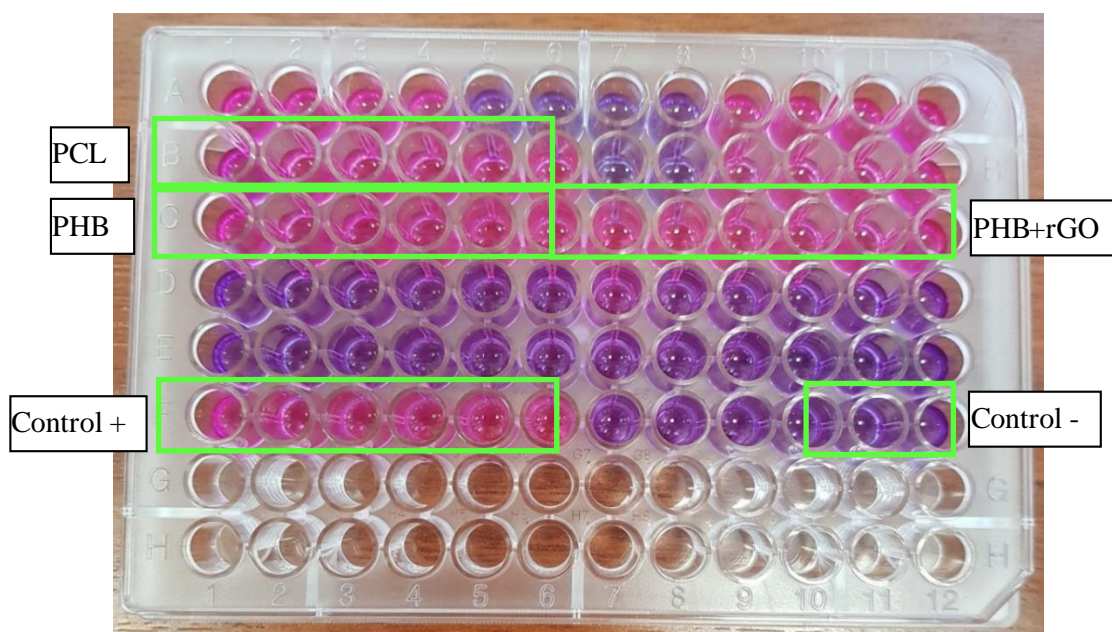


Рисунок 10 Планшет микротитрационный 96-луночный с образцами после окрашивания

Таблица 2 – Анализируемые суспензии

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
В	100% DMEM	80% DMEM+20% экстракта	60% DMEM+40% экстракта	40% DMEM+60% экстракта	20% DMEM+80% экстракта	100% экстракта						
С	100% DMEM	80% DMEM+20% экстракта	60% DMEM+40% экстракта	40% DMEM+60% экстракта	20% DMEM+80% экстракта	100% экстракта	100% экстракта	20% DMEM+80% экстракта	40% DMEM+60% экстракта	60% DMEM+40% экстракта	80% DMEM+20% экстракта	100% DMEM
F	Контроль +	Контроль +	Контроль +	Контроль +	Контроль +	Контроль +					Контроль -	Контроль -

Таблица 3 – Оптическая плотность исследуемого экстракта при длине волны 570 нм

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
В	0,7897	0,8471	0,8675	0,8896	0,8899	0,8532						
С	0,8503	0,8854	0,954	0,8930	0,8778	0,8496	0,8733	0,8464	0,8074	0,8402	0,8427	0,8642
F	0,7218	0,8014	0,8166	0,8495	0,8274	0,8348					0,5263	0,4860

Таблица 4 – Оптическая плотность исследуемого экстракта при длине волны 620 нм

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,07164	0,01064	0,01104	0,009642	0,01734	0,01234						
B	0,006342	0,007042	0,02304	0,01264	0,01394	0,01204	0,007642	0,007542	0,01184	0,01374	0,01164	0,01384
F	0,008642	0,008442	0,01184	0,009642	0,01094	0,01224					0,2406	0,2202

3.6 Фиксация и окраска клеток с использованием красителей

Для детекции адгезии и пролиферации клеток на биоматериалы сначала все образцы стерилизовались в 70% спирте на шейкере в течение 30-40 минут. Каждого образца было взято по 5 штук, так как подсчет клеток производился спустя 24 часа и 72 часа, также один образец был контрольным.

Далее перенесли образцы в эппендорф с 1 мл натрий-фосфатного буфера (PBS) для удаления спирта, более того, данное смачивание позволило уложить образцы на дно лунки планшета.

Для приготовления суспензии, клетки 3T3-L1 были сначала разморожены, затем перенесены в пробирки типа Falcon и добавили DMEM. Для отделения мертвых и разрушенных клеток использовалась центрифуга. После получения суспензии живых клеток, они были подсчитаны при помощи счетчика клеток Countess II FL. Далее внесли по 100 мкл суспензии с 10000 клетками к образцам и контролям в 96-луночную планшете. Поставили в термостат на сутки при 37 °C с подачей CO₂.

Прижизненное окрашивание производили раствором 1 мкг / мл Hoechst 33342, который окрашивает ядра всех клеток, и 1 мкг / мл кальцеина (флуорексона), который превращается в зеленый флуоресцентный кальцеин после гидролиза ацетоксиметилового эфира внутриклеточными эстеразами живой клетки [32].

В раствор PBS добавили Hoechst 33342 с конечной концентрацией 5,7 мкг/мл и кальцеина – 2,86 мкг/мл. Для количественного определения количества жизнеспособных клеток подготовили и окрасили n = 2 каждого вида образца спустя первые 24 часа. Из лунок с образцами и контролей удалили среду, добавили краситель. Поставили инкубироваться в течение 30 минут.

Также были проведены эксперименты с разным сочетанием красителей.

Йодид пропидия (PI) – является непроницаемым для клеточной мембраны и окрашивает только нуклеиновые кислоты апоптотических или некротических клеток. Максимум излучения наблюдается при 617 нм [33].

Акридиновый оранжевый по-разному взаимодействует с одонитевыми и двунитевыми молекулами РНК и ДНК. В результате окрашивания двунитевые молекулы нуклеиновых кислот флуоресцируют зеленым светом, а одонитевые – красным. Связывание акридинового оранжевого с нуклеиновой кислотой происходит как у живых, так и у мертвых клеток. Максимумом эмиссии приходится на 525 нм (зеленый) и 650 нм (красный) [34].

Молекула фаллоидина способна избирательно связываться с полимеризованным фибриллярным актином — важнейшим компонентом клеточного цитоскелета. Так как не растворяется в воде, необходимо растворять его в метаноле. При использовании на клетках оставляется на открытом воздухе для полного испарения метанола, который может повлиять на качество окраски. Фиксация производится в формальдегиде, который готовят разведением параформальдегида (полимеризованного формальдегида) на буфере. Продолжительность фиксации в формальдегиде зависит от характеристик фиксируемого объекта и составляет обычно от 15 минут для отдельных клеток до суток для крупных, плохо проницаемых тканей. 583 нм – максимум излучения [35].

3.7 Флуоресцентная микроскопия

Микроскопы - это инструменты, предназначенные для получения увеличенных визуальных или фотографических изображений небольших объектов. Микроскоп должен выполнять три задачи: создавать увеличенное изображение образца, разделять детали на изображении и визуализировать детали, видимые человеческим глазом или камерой. Флуоресцентная микроскопия позволяет увидеть строение клетки, ее рост и пролиферацию. Излучение света в процессе флуоресценции происходит почти одновременно с поглощением возбуждающего света из-за относительно короткой временной

задержки между поглощением и испусканием фотона, обычно составляющей менее микросекунды. Когда излучение сохраняется дольше после того, как возбуждающий свет погас, это явление называется фосфоресценцией [36].

Результаты роста клеток получены с использованием микроскопа инвертированного для лабораторных исследований Axio Vert.A1 Carl Zeiss, изображенный на рисунке 11. Образцы были рассмотрены в светлом и темном полях. NucleoCounter 33342 имеет максимальное флуоресцентное излучение при 461 нм, а кальцеин – при 517 нм. Поэтому для съемки устанавливались фильтры GFP 470 нм и DAPI 385 нм, объектив использовался с увеличением в 10 и 20 крат. В качестве источника возбуждения света выступает светодиодная лампа.

Благодаря оптической микроскопии были обнаружены графеновые вкрапления в составе РНВ.



Рисунок 11 Микроскоп Axio Vert.A1 Carl Zeiss

5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Нехватка органов и поврежденных тканей для трансплантации побудила к усовершенствованию биоматериалов в области тканевой инженерии. В 2010 году сообщалось, что было удовлетворено только 10% необходимых органов для трансплантации во всем мире, что подчеркивает перспективу быстрого расширения тканевой инженерии [1]. Они позволят отказаться от продолжительного ожидания донорских тканей и уменьшить риск отторжения пациентом. Не менее важным положительным моментом является снижение стоимости лечения по сравнению с методом трансплантации.

В данной работе разрабатывается проект получения и исследования 3D скаффолдов для использования в биомедицине в качестве каркасов, стимулирующих рост тканей человека.

Цель экономического анализа заключается в определении материальных затрат, которые необходимы в ходе получения новых скаффолдов.

5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Коммерческая привлекательность научного исследования определяется с одной стороны превышением технических параметров над предыдущими разработками, с другой - наличием рыночного спроса на продукт. Последнее предполагает наличие заинтересованных потребителей в лице частных лиц.

Основными потребителями полимерных биоразлагаемых скаффолдов будут люди с дефектами костной ткани, включая переломы, остеопороз и остеоартрит. Данные скаффолды помогут ускорить процесс регенерации костей.

Таблица 14 – Карта сегментирования рынка по виду применения продукта

Область применения	Материалы		
	Скаффолды	Перевязочные средства	Пьезоэлектрические излучатели/приемники
Медицина			
Тканевая инженерия			
Биотехнология			

На основании таблицы можно сделать вывод о том, что данный продукт отвечает потребностям одновременно нескольких сегментов рынка, что говорит о том, что уровень спроса на него будет достаточно высоким.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений

Для любого рода новых разработок необходимо выявить и проанализировать как сильные, так и слабые стороны уже имеющихся аналогов, предлагаемых на рынке от потенциальных конкурентов.

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет сделать сравнительную оценку эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего улучшения. Наиболее целесообразно выполнять данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 15. Влиятельными предприятиями-конкурентами в области производства деградируемых биоматериалов являются «Q-Med AB» производственная компания из Швеции (K1) и биотехнологическая компания «Organovo» из США (K2).

Первая компания выпускает биоматериалы в виде гидрогелей для заполнения небольших дефектов костей или кожи. Для получения гидрогелей, данная компания использует дополнительные дорогостоящие компоненты.

Производство данной компании хорошо отлажено и прекрасно отмасштабировано, однако технология, используемая ими, устаревает.

Вторая компания также использует дополнительные средства, включаемые в структуру материала, но уже при производстве полноценных полимерных скаффолдов. Продукция данной компании находится на ранней стадии производства. Предприятие осуществляет продажу по всему миру.

Таблица 15 - Оценочная карта для сравнения конкурентных разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б ф	Б к 1	Б к 2	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Показатели оценки качества разработки							
1. Время производства	0,08	5	4	3	0,4	0,32	0,24
2. Прочность	0,06	5	4	4	0,3	0,24	0,24
3. Гидрофильность	0,05	5	4	4	0,25	0,2	0,2
4. Отсутствие дополнительных включений в структуре	0,06	5	3	3	0,3	0,18	0,18
5. Клеточный рост, миграция, дифференциация	0,1	5	3	4	0,5	0,3	0,4
6. Экологичность	0,05	5	4	4	0,25	0,2	0,2
7. Простота производства	0,03	5	4	4	0,15	0,12	0,12
8. Простота эксплуатации	0,04	5	5	5	0,2	0,2	0,2
9. Безопасность производства	0,05	4	4	4	0,2	0,2	0,2
10. Удобная упаковка	0,02	4	5	4	0,08	0,1	0,08
11. Возможность применения <i>in vivo</i>	0,05	5	4	4	0,25	0,2	0,2
12. Использование отечественного сырья	0,02	5	2	2	0,1	0,04	0,04
13. Чистота конечного продукта	0,02	4	3	4	0,08	0,06	0,08
14. Универсальность конечного продукта	0,03	4	3	3	0,12	0,09	0,09
15. Необходимость в сложном и громоздком оборудовании	0,04	4	3	4	0,16	0,12	0,16
Показатели оценки коммерческого потенциала разработки							
16. Соответствие импортозамещающей политике	0,04	5	2	2	0,2	0,08	0,08

Продолжение таблицы 15

17. Признание компании на мировом рынке	0,03	3	4	5	0,09	0,12	0,15
18. Уровень проникновения на рынок	0,03	3	4	5	0,09	0,12	0,15
19. Цена конечного продукта	0,08	4	4	5	0,32	0,32	0,4
20. Предполагаемый срок эксплуатации	0,04	5	3	3	0,2	0,12	0,12
21. Рекламная политика фирмы	0,02	4	5	5	0,08	0,1	0,1
22. Наличие сертификации разработки	0,06	4	4	5	0,24	0,24	0,3
Итого	1	98	81	86	4,53	3,67	3,93

Опираясь на оценочную карту сравнения конкурентных технических и экономических решений, предлагаемая разработка превосходит, по суммарной оценке технических и экономических показателей, своих возможных конкурентов.

Анализ конкурентных технических решений проводится по формуле:

$$K = \sum B_i * B_i \quad (2)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента; B_i – вес показателя (в долях единицы); B_i – балл i-го показателя. Полученные данные таблицы 6, показывают хорошую конкурентоспособность, особенно по следующим критериям: безопасность, время и степень очистки.

Расчет коэффициента конкурентоспособности:

$$K_f/K_{k1} = 1,21;$$

$$K_f/K_{k2} = 1,14.$$

Показатель выше 1 свидетельствует о том, что продукт конкурентоспособен и имеет свои преимущества. Данная разработка является эффективной для производства.

5.1.3 SWOT-анализ

SWOT – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

SWOT-анализ проводится в несколько этапов. На первом этапе оцениваются сильные и слабые стороны проекта, возможности и угрозы.

Следующий этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды, для чего составляются интерактивные матрицы.

Данные по анализу разработки данной исследовательской работы проиллюстрированы в таблице 16.

Таблица 16 - Матрица SWOT

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная экономичность и ресурсоэффективность технологии С2. Экологичность технологии С3. Более низкая стоимость производства по сравнению с другими технологиями С4. Простота технологии С5. Возможность модифицировать материалы	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Высокая продолжительность изготовления материалов Сл2. Отсутствие необходимых клеточных линий Сл3. Отсутствие необходимых условий и оборудования для углубленного изучения биосовместимости Сл4. Отсутствие патента на разработку
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Использование инфраструктуры СибГМУ В3. Появление дополнительного спроса на новый продукт	В1С1С3С5 В2С2С3С4 В3С1С2С3С4 В4С1С2С3С4С5 В5С1С3	В1Сл1Сл2Сл3Сл4 В2Сл1Сл3Сл4 В3Сл1Сл4 В4Сл1Сл2Сл4 В5Сл1

Продолжение таблицы 16

В4. Привлечение инвестиций на развитие инновационного бизнеса В5. Повышение стоимости конкурентных разработок		
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Конкуренция имеющихся технологий производства У3. Ограничение возможности вхождения на российский рынок У4. Введения дополнительных требований к сертификации продукции У5. Несвоевременное финансовое обеспечение исследования со стороны государства У6. Недоверие покупателей к новому продукту	У1С3С4 У2С1С2С3С4С5 У3С1С3С4 У4С1С3С4 У5С1С3 У6С3С5	У1Сл1Сл3 У2Сл1Сл3Сл4 У3Сл1Сл2Сл3Сл4 У4Сл1Сл3Сл4 У5Сл1Сл3Сл4 У6Сл1Сл3

Таблица 17 - Интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта						
Возможности проекта		С1	С2	С3	С4	С5
	В1	+	-	+	0	-
	В2	-	+	+	+	-
	В3	+	+	+	+	0
	В4	+	+	+	+	+
	В5	+	0	+	0	-

Таблица 18 - Интерактивная матрица проекта

Слабые стороны проекта					
Возможности проекта		Сл.1	Сл.2	Сл.3	Сл.4
	В1	+	+	+	+
	В2	+	0	+	+
	В3	+	-	0	+
	В4	+	+	0	+
	В5	+	-	0	0

Таблица 19 - Интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта						
Угрозы проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	У1	-	0	+	+	0
	У2	+	+	+	+	+
	У3	+	0	+	+	-
	У4	+	-	+	+	-
	У5	+	0	+	-	0
	У6	0	0	+	0	+

Таблица 20 - Интерактивная матрица проекта

Слабые стороны проекта					
Угрозы проекта		Сл.1	Сл.2	Сл.3	Сл.4
	У1	+	0	+	-
	У2	+	-	+	+
	У3	+	+	+	+
	У4	+	-	+	+
	У5	+	-	+	+
	У6	+	0	+	-

Таблица 21 - SWOT-анализ

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная экономичность и ресурсоэффективность технологии С2. Экологичность технологии С3. Более низкая стоимость производства по сравнению с другими технологиями С4. Простота технологии С5. Возможность модифицировать материалы	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Высокая продолжительность изготовления материалов Сл2. Отсутствие необходимых клеточных линий Сл3. Отсутствие необходимых условий и оборудования для углубленного изучения биосовместимости Сл4. Отсутствие патента на разработку
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Использование инфраструктуры СибГМУ В3. Появление дополнительного спроса на новый продукт	В связи с уникальными свойствами разработки (экологичность, экономичность и т.д.) необходим продвигать разработку на российский рынок.	Несмотря на достоинства разработки и на наличие возможностей ее реализации имеется большая конкуренция. Для решения этой проблемы необходимо большее количество оборудования, которое позволит ускорить исследование материалов,

Продолжение таблицы 21

В4. Использование разработки в промышленных масштабах В5. Повышение стоимости конкурентных разработок	Следует заинтересовывать инвесторов, чтобы данный проект нашел практическое применение в промышленности.	а также использование оборудования и возможности СибГМУ.
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Конкуренция имеющихся технологий производства У3. Ограничение возможности вхождения на российский рынок У4. Введения дополнительных требований к сертификации продукции У5. Несвоевременное финансовое обеспечение исследования государством У6. Недоверие покупателей к новому продукту	Из-за большого импорта лекарственных средств ограничено вхождение на российский рынок. Следует усиленно продвигать разработку с целью создания спроса и получения финансирования для дальнейшего развития. Дальнейшее углубленное изучение материалов позволит улучшить безопасность нового продукта.	Следует выработать маркетинговую стратегию в области продвижения разработки на рынок. Следует расширить собственный музей линий клеток человека. Необходимо запатентовать разработку. Более точные и углубленные исследования позволят дать характеристику безопасности покупателям.

Научной группе следует обратить внимание на слабые стороны научно-исследовательского проекта, а именно на отсутствие необходимого оборудования, клеточных линий и патента на разработку. Были приняты стратегии: усиленно продвигать разработку с целью создания спроса; поиск финансирования для дальнейшего развития разработки; наладить сотрудничество с научными группами, занимающимися близкими разработками.

5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

Для оценки готовности проекта составлена таблица 22. Система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта.

Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 – в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

Таблица 22 – Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/ п	Наименование	Степень проработаннос ти научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчи ка
1	Определен имеющийся научно-технический задел	5	5
2	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	5	4
3	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	5
4	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4
5	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	4
6	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	4	3
7	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	4	4
8	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	2	4
9	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	4	3
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	4	4
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	4	4
12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	4	4

Продолжение таблицы 22

13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	4
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	5
15	Проработан механизм реализации научного проекта	5	5
	ИТОГО:	60	62

Значение суммы баллов позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. По сумме баллов можно говорить о том, что перспективность проекта выше среднего. Для реализации данного проекта необходимо собрать компетентную команду.

4.1.5. Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существует несколько методов получать прибыль из результатов научных трудов. При реализации скаффолдов можно использовать следующие методы коммерциализации:

Торговля патентными правами и разработками технологий модификации, т.е. передача третьим лицам права использования объектов интеллектуальной собственности на лицензионной основе.

Доведение скаффолдов до клинических испытаний и заключение контракта с компаниями по масштабному производству каркасов для использования в медицинских целях.

Внедрение данной разработки не только в биомедицинской отрасли, но и в электронике в качестве датчиков, благодаря пьезоэлектричеству, что приведет к ускоренному получению прибыли с разработки.

Инициация проекта – первоочередной этап деятельности, касающийся проекта. В рамках процессов инициации проекта выполняется определенный набор работ для его успешного запуска. Для этого выявляются изначальные цели и содержание разработки, также фиксируются финансовые ресурсы. В рамках процессов инициации определяются внутренние и внешние

заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать и влиять на общий результат научного проекта.

Таблица 23 - Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научный руководитель	Получение полимерных скаффолдов с целью изучения его воздействия на клетки (in vitro) и организм (in vivo) в дальнейшем/
Студент, выполняющий научную работу	Исследования методов получения скаффолдов, их модифицирование и проведение in vitro тестов

Таблица 24 - Цели и результаты исследования

Цели проекта:	Создание и определение биосовместимости полимерных скаффолдов
Ожидаемые результаты проекта:	Оформление результата в форме научной работы, с выходом научных статей
Критерии приемки	Наличие характеристики полученного объекта с применением инструментальных способов
Требования к результату проекта	Наличие обоснованного протокола пассажа клеток, их детекции для проведения дальнейших доклинических испытаний

4.1.6 Организационная структура проекта

При проведении организации проекта, необходимо определить членов входящих в рабочую группу проекта, определить их роли, прописать функции, выполняемые каждым из участников и определить их трудозатраты.

Таблица 25 - Рабочая группа проекта

ФИО, Основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции
к.х.н. Плотников Е.В., доцент ИШХБМТ ТПУ	Руководитель	Распределение обязанностей, выдвижение плана исследований, корректировка действий по срокам, бюджету
Хан Е.А., магистрант ИШХБМТ ТПУ	Исполнитель	Выполнение научных исследований

5.2 Планирование научно-исследовательских работ

5.2.1. Структура работ в рамках научного исследования

В данном разделе составляется перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования, провести распределение исполнителей по видам работ. НИР включает в себя:

1. Подготовительный этап. Проведение сбора и изучение литературных данных, составление литературного обзора по исследуемой тематике.
2. Проведение экспериментов.
3. Выводы и обсуждение результатов по исследуемой работе.
4. Завершающий этап. Написание отчета, защита ВКР.

Примерный порядок составления этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам работ приведен в таблице 26.

Таблица 26 - Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
Разработка ТЗ	1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель
Выбор направления исследования	2	Подбор и изучение материалов по теме	Инженер
	3	Выбор направления исследований	Руководитель, инженер
	4	Календарное планирование работ по теме	Руководитель, инженер
Теоретические и экспериментальные исследования	5	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Инженер
	6	Построение макетов (моделей) и проведение экспериментов	Инженер
	7	Сопоставление результатов экспериментов с теор. исследованиями	Руководитель, инженер
Обобщение и оценка результатов	8	Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, инженер
	9	Определение целесообразности проведения ОКР	Руководитель, инженер
<i>Проведение ОКР</i>			
Оформление отчета по НИР (комплекта документации по ОКР)	10	Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	Инженер

5.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожі}$ используется следующая формула:

$$t_{ожі} = \frac{3t_{mini} + 2t_{maxi}}{5}, \quad (3)$$

где $t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i -ой работы чел.-дн.; t_{mini} – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы, чел.-дн.;

t_{maxi} – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.

Формула для определения продолжительности работ в рабочих днях:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожі}}{Ч_i}, \quad (4)$$

где T_{pi} – продолжительность одной работы, раб. дн.;

$t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.

$Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования

Формула для перевода рабочих дней в календарные:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (5)$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i -й работы в календарных днях;

T_{pi} – продолжительность выполнения i -й работы в рабочих днях; $k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (6)$$

$$k_{\text{кал}} = \frac{365}{365 - 52 - 14} = 1,22$$






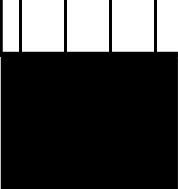




где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году; $T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году; $T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.



Таблица 27 - Временные показатели проведения НИ

Название Работы (Этапы)	Трудоёмкость работ			Исполнители	Длительность работ в рабочих днях T_{pi}	Длительность работ в календарных днях T_{ki}
	t_{min} , чел-дни	t_{max} , чел-дни	$t_{\text{ожл}}$, чел-дни			
Разработка технич. задания	1	3	1,8	Руководитель	1,8	3
Подбор и изучение материалов по теме	17	21	18,6	Инженер	22,6	28
Выбор напр. исслед.	4	6	4,8	Руков., инженер	2,4	4
Календарное планирование работ	2	4	2,4	Руков., инженер	1,2	2
Проведение теоретических расчетов и обоснований	7	10	8,2	Инженер	8,2	13
Построение моделей и проведение экспериментов	27	30	28,2	Инженер	29,2	42
Сопоставл. результ. эксперим. с теоретич. исслед.	4	6	4,8	Руков., инженер	2,4	4
Оценка эффективности полученных результатов	2	4	2,4	Руков., инженер	1,2	2
Опред. целесообраз. проведения ОКР	2	4	2,4	Руков., инженер	1	2
Оформление отчета по НИР	7	9	7,8	Инженер	9,8	12
Итого				Руководитель	10	17
Итого				Инженер	78	112

Диаграмма Ганта - горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

Таблица 28 - Календарный план-график проведения НИОКР

№ раб от	Вид работ	Исполнители	T _{кi} , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ													
				февр		март			апрель			май			июнь		
				2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
1	Составле- ние ТЗ	Руководитель	3														
2	Изучение литературы	Инже нер	28														
3	Выбор на пр. исслед.	Руководитель, инже нер	4														
4	Календарн. планир.	Руководитель, инже нер	2														
5	Теор. расч. и обос нов.	Инже нер	13														
6	Постр. моделей, провед. эксперим.	Инже нер	42														
7	Сопост. результ. исслед. с теор.	Руководитель, инже нер	4														
8	Оценка эффективн.	Руководитель, инже нер	2														
9	Опред. целесообр. ОКР	Руководитель, инже нер	2														
10	Оформлен ие отчета по НИР	Инже нер	12														

 - руководитель  - инженер

В результате видно, что для выполнения работы требуется всего 2 человека, и работа выполняется в течение 112 дней.

5.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

Цель раздела: рассчитать бюджет по основным видам затрат. В процессе формирования бюджета научно-технического исследования (НТИ) используется следующая группировка затрат по различным статьям.

5.2.4.1 Расчет материальных затрат НТИ

Расчет материальных затрат осуществляется по следующей формуле:

$$Z_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m C_i \cdot N_{расч i} \quad (7)$$

где m – количество видов материальных ресурсов, потребляемых при

выполнении научного исследования;

$N_{расхi}$ – количество материальных ресурсов i -го вида, планируемых к использованию при выполнении научного исследования (шт., кг, м, м² и т.д.);

$Ц_i$ – цена приобретения единицы i -го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м² и т.д.);

k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы (15%)

Таблица 29 – Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (З _м), руб.
Поликапролактон	Грамм (г)	5 г	5942,44	6507,9
Полигидроксибутират	Грамм (г)	100 г	23935,95	4787,19
Оксид графена восстановленный	Грамм (г)	250 г	30598,28	6731,62
DMEM	Литр (л)	1 л	2303,7	1503
Хлороформ	Литр (л)	1,5 л	226	339
Трипсин	Литр (л)	0,1 л	4229,42	2114
Alamar Blue	комплект	1 шт	30952,7	30952,7
Кальцеин (Флуорексон)	Грамм (г)	5 г	21028,94	8832,15
Ноеchst 33342	Литр (л)	0,001	19020,56	10670,22
Трипановый синий	Литр (л)	0,1 л	1623	450
Пробирки центрифужные (50 мл)	Упаковка	20 шт	600	1200
Пробирки центрифужные (30 мл)	Упаковка	40 шт	800	800
Итого				69887,78

5.2.4.2 Расчет затрат на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью входят все затраты, связанные с приобретением специального оборудования, необходимого для проведения работ по конкретной теме. Стоимость оборудования, используемого при выполнении

конкретного НТИ и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в калькуляции в виде амортизационных отчислений.

Амортизация оборудования рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k}, \quad (8)$$

где C_n - первоначальная стоимость оборудования;

H_a - норма амортизации, %;

n – количество дней использования оборудования;

k – количество рабочих дней в году (2021 год - 247 раб. дней).

Расчет затрат на специальное оборудование заключается в расчете электроэнергии, использующейся при эксплуатации бокса биологического, автоклава, счетчика клеток, центрифуги, микроскопа сводятся в таблице 30.

Таблица 30 – Расчет бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, руб.
1.	Термостат Электрический суховоздушный ТС-1/20 СПУ	1	14500
2.	Бокс биологической безопасности 2 класса Streamline SC2-4A 1	1	193500
3	Автоклав паровой Tuttnauer 2340 МК	1	110200
4	Микроскоп инвертированный Primo Vert	1	70000
5	Центрифуга Sigma 2-6E	1	75800
6	Счетчик клеток Countless II FL	1	62516
7	Спектрофотометр Multiskan Go	1	222110
Итого			748626

Таблица 31 - Расчет амортизации оборудования

№ п/п	Наименование оборудования	C_n , руб	H_a , %	n , дн	A , руб
1.	Термостат Электрический суховоздушный ТС-1/20 СПУ	14500	10	30	176,11

Продолжение таблицы 31

2.	Бокс биологической безопасности 2 класса Streamline SC2-4A 1	193500	10	16	1253,44
3	Автоклав паровой Tuttinauer 2340 МК	110200	10	6	267,69
4	Микроскоп инвертированный Primo Vert	70000	10	24	680,16
5	Центрифуга Sigma 2-6E	75800	10	8	245,51
6	Счетчик клеток Countless II FL	62516	10	16	404,96
7	Спектрофотометр Multiskan Go	222110	10	4	359,69
Итого:					3387,56

При расчете затрат на электроэнергию стоит учитывать только то, что идет на технологические цели, потому что затраты на освещение и смежные цели относятся к общеустановленным расходам. Данные отображены в таблице 32.

Затраты на электроэнергию рассчитываются по формуле:

$$Z_3 = N \cdot T \cdot C, \quad (9)$$

где N – потребляемая мощность установки, кВт;

T – время работы оборудования, ч;

C – стоимость 1кВт·час электроэнергии (5,8 руб.)

Таблица 32 - Расчет затрат на электроэнергию

№ п/п	Наименование оборудования	N, кВт/ч	T, ч	Затраты, руб
1.	Термостат Электрический суховоздушный ТС-1/20 СПУ	0,25	720	1044
2.	Бокс биологической безопасности 2 класса Streamline SC2-4A1	1,5	30	261
3	Автоклав паровой Tuttinauer 2340 МК	2,4	60	835,2
4	Микроскоп инвертированный Primo Vert	0,75	48	208,8
5	Центрифуга Sigma 2-6E	0,13	1	0,754
6	Счетчик клеток Countless II FL	0,05	4	1,16
7	Спектрофотометр Multiskan Go	0,11	1	0,638
Итого:				2351,552

5.2.4.3 Основная заработная плата исполнителей темы

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату:

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (10)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата;

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $Z_{осн}$).

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_{раб}, \quad (11)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (12)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 48 раб. дней $M = 10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (табл. 33).

Таблица 33 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	44	48
- праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
- отпуск	56	28
- невыходы по болезни	1	2
Действительный годовой фонд рабочего времени	250	273

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (13)$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3;

$k_{д}$ – коэффициент доплат и надбавок (0,2 – 0,5);

$k_{р}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Таблица 34 – Расчёт основной заработной платы

Исполнители	$Z_{б}$, руб.	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	$Z_{м}$, руб.	$Z_{дн}$, руб.	$T_{р}$, раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	35120	0,3	0,4	1,3	77615,2	3228,8	10	32288
Инженер	16140	0	0	1,3	20928	797,3	78	62189,4
Итого $Z_{осн}$								94477,4

5.2.4.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (14)$$

где $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (примем равным 0,12).

$$Z_{доп(рук)} = 0,12 \cdot 32288 = 3874,56 \text{руб}$$

5.2.4.5 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (15)$$

где $k_{внеб}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды. Для учреждений, осуществляющих образовательную и научную деятельность установлено, что отчисления имеют коэффициент отчислений равный 30,2%.

Таблица 35 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	32288	3874,6
Инженер	62189,4	7462,7
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,302	
Итого: 31839,2		

5.2.4.6 Накладные расходы

Величина накладных расходов определяется по следующей формуле:

$$З_{\text{накл}} = (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}) \cdot k_{\text{накл}} \quad (16)$$

$$З_{\text{накл}} = (94477,4 + 11336,9) \cdot 0,16 = 16930,29 \text{ руб}$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

5.2.4.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

Таблица 36 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НТИ	69887,78	Пункт 5.2.4.1
2. Амортизационные отчисления на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	3387,56	Пункт 5.2.4.2
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	94477,4	Пункт 5.2.4.3
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	11337,3	Пункт 5.2.4.4
5. Отчисления во внебюджетные фонды	31839,2	Пункт 5.2.4.5
6. Накладные расходы	16930,29	16 % от суммы ст. 3-4
7. Бюджет затрат НТИ	227859,53	Сумма ст. 1- 6

5.3 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}}, \quad (17)$$

где $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения;

Φ_{\max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (18)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта исполнения разработки;

a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Таблица 37 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
1. Скорость выпуска скаффолда	0,25	5	4	3
2. Клеточная адгезия	0,15	5	5	4
3. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,15	5	4	5
4. Энергосбережение	0,15	5	4	4
5. Надежность	0,10	4	4	5
6. Экологичность	0,20	5	5	3
Итого	1	4,9	4,35	3,8

Исполнение 1 соответствует данному проекту, исполнение 2 – разработке «Q-Med AB» производственной компании из Швеции, исполнение 3 – разработке биотехнологической компании «Organovo» из США

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки (I_{ucni}) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{\text{исп.1}} = \frac{I_{\text{р-исп1}}}{I_{\text{исп.1}}^{\text{финр}}}, \quad (19)$$

Сравнительная эффективность проекта ($\mathcal{E}_{\text{ср}}$):

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{исп.1}}}{I_{\text{исп.2}}}, \quad (20)$$

Таблица 38 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,991	0,992	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,9	4,35	3,8
3	Интегральный показатель эффективности	4,94	4,38	3,8
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	0,89	0,77

Из полученной таблицы можно сделать вывод, что текущий проект имеет большую эффективность по сравнению с аналогами, но также имеет свои недостатки.

6 Социальная ответственность

Введение

Целью выпускной квалификационной работы является определение биосовместимости новых полимерных материалов с использованием клеточных технологий. Потенциальными потребителями проекта являются научно-исследовательские лаборатории, занимающиеся исследованиями в области медицины, тканевой инженерии и биотехнологии. Конечный продукт в виде скаффолдов может быть использован в качестве имплантов, как вспомогательный элемент регенерации тканей человека. Работа проводилась в биологической лаборатории Научного парка Томского Политехнического Университета с использованием клеточной линии эмбриональных фибробластов мышей 3T3-L1. Для обеспечения микробиологической безопасности работы проводились с соблюдением условий стерильности. Работы с токсичными, летучими веществами, вдыхание которых может вызвать острое отравление, головокружение, усталость и головную боль, при синтезе скаффолдов проводились с использованием средств индивидуальной защиты при работающей вытяжной вентиляции. Кроме того, использовалось такое оборудование как термостат, автоклав, ламинарный шкаф, а также микроскоп и т.д.

6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

В соответствии с трудовым кодексом РФ [41] запрещается применение труда лиц, не достигших восемнадцати лет, на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

В целях сохранения и повышения работоспособности, ускорения адаптации к действию неблагоприятных условий труда, профилактики заболеваний, работающим в контакте с химическими веществами следует два раза в год проводить витаминизацию. В соответствии с техническим регламентом [42] каждому работнику лаборатории выдаются средства

индивидуальной защиты, а также смывающие и обезвреживающие средства, прошедшие обязательную сертификацию соответствия в установленном законодательством РФ о техническом регулировании порядке, в соответствии с установленными нормами. Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение, инструктажи и проверка знаний работников требований безопасности труда [43].

Продолжительность и особенности режима рабочего времени и времени отдыха работников определяются Трудовым кодексом Российской Федерации. Для работников лаборатории устанавливается шестидневный рабочий день. Компенсация при работе во вредных условиях составляет 4% к окладу.

Рабочее место возле термошкафа должно предусматривать свободный доступ к любой части для контроля над процессом и ремонта. Также установка не должна загромождать пути эвакуации в случае ЧС и закрывать собой предупредительные знаки и сигналы.

6.2 Производственная безопасность

Для идентификации потенциальных факторов в таблице 39 представлены опасные и вредные факторы при выполнении работ по совершенствованию этапов безопасности этапов биосинтеза [44].

Таблица 39 – Возможные опасные и вредные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативные документы
	Разра- ботка	Изго- товлен ие	Экспл уатаци я	
1. Химические (токсические, раздражающие)		+	+	ГОСТ 12.1.007-76 [45]
2. Отсутствие или недостаток естественного света	+	+		СанПиН 1.2.3685-21 [46]
3. Превышение уровня шума	+	+		СанПиН 1.2.3685-21 [46]
4. Отклонение показателей микроклимата	+	+		СанПиН 1.2.3685-21 [46]

Продолжение таблицы 39

5. Повышенная или пониженная температура поверхностей оборудования, нефтепродуктов		+		ГОСТ 12.1.005–88 [47]
6. Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+		ГОСТ 12.2.003-91 [48]

6.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов

6.2.1.1 Химические (токсические, раздражающие)

Воздействие вредных химических веществ может произойти: при вдыхании, при контакте, при поглощении, при уколе иглой, через поврежденную кожу. При работе в лаборатории должна использоваться следующая спецодежда и средства индивидуальной защиты: халат хлопчатобумажный, фартук прорезиненный, резиновые сапоги и перчатки, очки защитные, респиратор или противогаз [45].

При приготовлении растворов полимеров в хлороформе следует избегать вдыхания паров данных смесей. Для предотвращения данного опасного фактора необходимо использовать вытяжку и респиратор.

Хлороформ – не горюч, не взрывоопасен, обладает наркотическими свойствами, оказывает токсическое действие на организм человека, вызывает острую или хроническую интоксикацию. На воздухе медленно окисляется с выделением хлора, хлористого водорода и фосгена, скорость разложения возрастает на свету и при воздействии повышенных температур.

Хлороформ - наркотик, который может вызвать паралич нервной системы у человека, катары слизистых оболочек, при попадании на кожу - сухость.

Производственные помещения, в которых проводят работы с хлороформом, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

Производственное оборудование должно быть герметичным, места отбора проб должны быть оборудованы местными отсосами.

Отходы хлороформа обезвреживают и утилизируют: нейтрализующий раствор отпаривают от растворенных хлорметанов и сливают в канализацию.

Этанол – одноатомный спирт с формулой C_2H_5OH , второй представитель гомологического ряда одноатомных спиртов, при стандартных условиях летучая, горючая, бесцветная прозрачная жидкость. Молекулярная масса 46,069 а. е. м., температура плавления – 114,15 °С, Температура кипения 78,39 °С, Критическая точка 241 °С (при давлении 6,3 МПа). Этиловый спирт также используется как топливо, в качестве растворителя, как наполнитель в спиртовых термометрах и как дезинфицирующее средство (или как компонент его).

Этиловый спирт в зависимости от пути и дозы попадания может вызывать угнетение функций центральной нервной системы.

При работе в лаборатории должна использоваться следующая спецодежда и средства индивидуальной защиты: халат хлопчатобумажный, фартук прорезиненный, резиновые сапоги и перчатки, очки защитные, респиратор или противогаз.

Таблица 40 - Характеристики токсичных свойств сырья и вспомогательных материалов.

Название вещества	Агрегатное состояние при условиях производства	Класс опасности	ПДК, мг/м ³	Первая помощь
1	2	3	4	5
Этиловый спирт C_2H_5OH	Жидкое	4	1000	Свежий воздух, покой
Хлороформ $CHCl_3$	Жидкое	4	1000	При попадании через рот – обильное промывание водой.

6.2.1.2 Отсутствие или недостаток естественного света

Недостаток естественного света в труднодоступных местах так же относится к вредным факторам. Требования к освещению рабочих мест зафиксированы в СанПиН 1.2.3685-21 [46]. В таблице 3 представлены нормы освещенности.

Плохое и неравномерное освещение приводит к снижению остроты зрения, повышению нагрузки на глаза, увеличивается общий уровень утомляемости, что отрицательно влияет на работоспособность. Для обеспечения нормируемых значений освещенности в лаборатории, где проводилось исследование имеются остекленные оконные проемы, люминесцентные лампы дневного освещения.

Биологическая лаборатория Научного парка Томского политехнического университета имеет размеры: длина $A = 10$ м; ширина $B = 7$ м; высота $H = 4,2$ м. Высота рабочей поверхности $h_{rp} = 0,8$ м. В соответствии со СП 52.13330.2016 [49]. характеристика зрительной работы высокой точности, контраст с фоном средний, пол и стены имеют светлую окраску, пол – темную. Требуется создать освещенность $E = 300$ лк.

Коэффициент отражения стен $R_c = 30\%$, потолка $R_n = 50\%$. Коэффициент запаса $k = 1,5$, коэффициент неравномерности $Z = 1,1$.

Рассчитываем систему общего люминисцентного освещения.

Выбираем светильники типа ОД, $\lambda = 1,4$.

Приняв $h_c = 0,4$ м, определяем расчетную высоту:

$$h = H - h_c - h_{rp} = 4,2 - 0,4 - 0,8 = 3 \text{ м.}$$

Расстояние между светильниками:

$$L = 1,4 \cdot 3 = 4,2 \text{ м.}$$

Расстояние от крайнего ряда светильников до стены:

$$L/3 = 1,4 \text{ м.}$$

Определяем количество рядов светильников и количество светильников в ряду:

$$n_{\text{ряд}} = \frac{\left(\frac{B-\frac{2}{3}L}{L}\right) + 1}{4,2} = \frac{\left(\frac{7-\frac{2}{3} \cdot 4,2}{4,2}\right) + 1}{4,2} = 2$$

$$n_{\text{св}} = \frac{\left(\frac{A-\frac{2}{3}L}{l_{\text{св}}+0,5}\right)}{1,27+0,5} = \frac{\left(\frac{10-\frac{2}{3} \cdot 4,2}{1,27+0,5}\right)}{1,27+0,5} \approx 4$$

При длине светильника 1,27 м, их общая длина составляет:

$$1,27 \cdot 4 = 5,08 \text{ м}$$

Расстояние между светильниками при этом составит:

$$\frac{10-5,08-2,8}{3} = 0,7 \text{ м.}$$

Размещаем светильники в 2 ряда. В каждом ряду можно установить 4 светильника типа ОД мощностью 50 Вт (с длиной 1,27 м), при этом разрыв между светильниками в ряду составят 70 см. Изображаем на рисунке 21 в масштабе план помещения и размещения на нем светильников. Учитывая, что в каждом светильнике установлено две лампы, общее число ламп в помещении $N = 16$. Способ размещения светильников в лаборатории – симметричный, это обеспечивает равномерное освещение оборудования и рабочих мест.

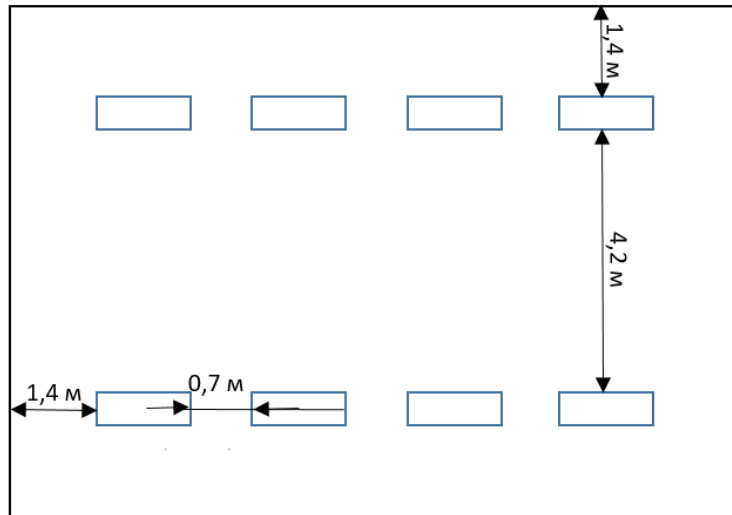


Рисунок 21. Схема расположения светильников в лаборатории

Находим индекс помещения

$$i = S / h(A+B) = 70 / (3(10+7)) = 1,37$$

По таблице 13 по СП 52.13330.2016 [49] определяем коэффициент использования светового потока:

$$\eta = 0,51$$

Определяем потребный световой поток ламп в каждом из рядов:

$$\Phi = \frac{E_n \cdot S \cdot K_3 \cdot Z}{N_L \cdot \eta} = \frac{300 \cdot 70 \cdot 1,5 \cdot 1,1}{16 \cdot 0,51} = 4246$$

По таблице 1 выбираем ближайшую стандартную лампу – ЛХБ 65 Вт с потоком 4400 лм. Делаем проверку выполнения условия:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{\text{л.станд}} - \Phi_{\text{л.расч}}}{\Phi_{\text{л.станд}}} \cdot 100\% \leq +20\%$$

$$\text{Получаем: } -10\% \leq 3,5\% \leq +20\%$$

Определяем электрическую мощность осветительной установки

$$P = 16 \cdot 65 = 1040 \text{ Вт.}$$

По результатам можно сделать вывод, что помещение лаборатории соответствует нормам.

6.2.1.3 Превышение уровня шума

Вредным фактором биологической лаборатории является повышенный уровень шума при работе системы вентиляции. Требования по допустимому уровню звукового давления, звука и эквивалентных уровней звука выполняются в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания" [46].

Уровень звука в микробиологической лаборатории не должен превышать 50 децибел. Вредное воздействие шума проявляется в прогрессирующем понижении слуха, что приводит к профессиональной глухоте, появляются головные боли, повышенная утомляемость. В связи с повышенным шумовым фоном (более 70 децибел) при работе системы вентиляции в биологической лаборатории должны производиться диагностика и ремонт системы вентиляции.

6.2.1.4 Отклонение показателей микроклимата

Оптимальные параметры микроклимата на рабочих местах соответствуют требованиям СанПиН 1.2.3685-21 [46] применительно к выполнению работ различных категорий в холодный и теплый период года.

Микробиологическая лаборатория оборудована системами отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной вентиляцией. Системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата в соответствии с требованиями. Для микробиологической лаборатории предусмотрены нормы производственной санитарии, указанные в таблице 41, которым соответствует лаборатория Томского политехнического университета.

Таблица 41 - Допустимые и оптимальные параметры микроклимата производственных помещений

Период года	Категория работ	Температура воздуха, °С			Относительная влажность, %		Скорость движения, м/с	
		Оптимальная	Допустимая					
			Диапазон ниже оптимальной величины	Диапазон выше оптимальной величины				
Теплый	Iб	21-23	19,0-20,9	23,1-24,0	40-60	15-75	0,1	0,1-0,2
Холодный		22-24	20,0-21,9	24,1-28,0	40-60	15-75	0,1	0,1-0,3

6.2.2 Анализ опасных факторов производственной среды

6.2.2.1 Повышенная или пониженная температура поверхностей

Источниками термического ожога могут быть нагретые участки оборудования для электроспиннинга, а также от предметов, простерилизованных в автоклаве.

Термические факторы, которые характеризуются тепловой энергией и аномальной температурой. К ним принадлежат: температура нагретых и охлажденных предметов и поверхностей, температура открытого огня и пожара, температура химических реакций. Возможно получение ожога [47].

Аппараты с повышенной температурой поверхности, например, автоклав или термостат, защищены специальными заградительными корпусами. При работе с оборудованием с повышенной и пониженной температурой поверхности исключается их непосредственный контакт с

кожными покровами, используются специальные ухваты и защитные перчатки из жароустойчивого материала.

6.2.2.2 Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека

В случае нашей работы источником опасных факторов является повышенное напряжение в электрической цепи электрооборудования, используемое в процессе проведения экспериментов. В лаборатории используются различные электроприборы: автоклав, ламинаторы, термостаты, электрообогревательные приборы. Источниками электрической опасности могут быть: оголенные части проводов или отсутствие изоляции, замыкания [48].

Электробезопасность работников лаборатории и студентов должна обеспечиваться выполнением следующих мероприятий:

- 1) Соблюдение соответствующих расстояний до токоведущих частей или путем их закрытия;
- 2) Ограждение токоведущих частей;
- 3) Применение блокировки аппаратов и ограждающих устройств с целью предотвращения ошибочных операций и доступа к токоведущим частям; применение предупреждающей сигнализации, надписей и плакатов;
- 5) Применение устройств для снижения напряженности электрических и магнитных полей до допустимых значений;
- 6) Использование средств защиты и приспособлений, в том числе для защиты от воздействия электрического и магнитного полей в электроустановках, в которых их напряженность превышает допустимые нормы.

По окончании рабочего дня нужно снять напряжение с отдельных приборов, а также отключить все щитки на лабораторных столах и общий рубильник за пределами лаборатории. Для контроля предельно допустимых значений напряжений прикосновения и токов измеряют напряжения и токи в

местах, где может произойти замыкание электрической цепи через тело человека. Класс точности измерительных приборов не ниже 2,5 [48].

6.2.3 Обоснование мероприятий по снижению уровней воздействия опасных и вредных факторов на исследователя

Помещение биологической лаборатории должно быть просторным и светлым. Лаборатория должна быть снабжена необходимыми приборами и оборудованием. В каждой лаборатории должна быть хорошая вентиляция, необходимо наличие вытяжного шкафа, в котором проводят работы с использованием дурно пахнущих или ядовитых соединений, а также обжиг различных веществ. В специальных вытяжных шкафах хранят легколетучие, вредные, дурно пахнущие и легковоспламеняющиеся вещества (кислоты и щелочи, органические жидкости и др.). В лаборатории также необходимы водопровод, канализация, проводка электрического тока. Лаборатория должна иметь установку для дистилляции воды, так как все опыты нужно проводить только с использованием дистиллированной воды. Кроме рабочих столов в лаборатории должны быть письменные столы, шкафы и тумбочки для хранения посуды и реактивов, приборные столы для установки различных приборов.

Необходимо, чтобы в каждой лаборатории проводилась всесторонняя политика по обеспечению безопасности, имелось руководство по безопасности и вспомогательные программы для проведения такой политики. Желательно периодически проводить проверки соблюдения техники безопасности самими сотрудниками лабораторий или приглашаемыми специалистами. Безопасная и эффективная работа лаборатории во многом зависит от вспомогательного персонала (уборочные, ремонтные службы), поэтому необходимо, чтобы такой персонал прошел надлежащее обучение технике безопасности. Необходимо иметь постоянно действующую программу обучения технике безопасности для того, чтобы лабораторный и

вспомогательный персонал был все время осведомлен о безопасных методах работы.

6.3 Экологическая безопасность

Лаборатория для работы с клеточными технологиями при правильном функционировании не является особо опасным объектом воздействия на окружающую среду. Однако существуют некоторые угрозы для окружающей среды. На атмосферу могут оказывать вредное воздействие выбросы вредных веществ при выполнении экспериментальной работы через вентиляционную систему. С целью охраны воздушного бассейна все работы должны проводиться в вытяжном шкафу при включенной вентиляции и обеспечении герметичности тары и установки.

Вредное воздействие на гидросферу может оказывать химическое загрязнение водотоков в результате удаления неорганических и органических отходов в хозяйственно-бытовую канализацию. Для предотвращения негативных воздействий проводится организации раздельного сбора и хранения неорганических и органических отходов, обезвреживание кислых и щелочных стоков согласно утвержденным инструкциям, регенерация растворителей [50].

В биологической лаборатории существуют твердые отходы в виде бытового мусора, который выбрасывается в урну. Твердые отходы в виде отработанного биоматериала подлежат обезвреживанию методом стерилизации и выбрасываются в мусорный контейнер.

6.4 Чрезвычайные ситуации

6.4.1 Пожаровзрывоопасные факторы

Пожаровзрывоопасность в лаборатории синтеза биологически активных соединений обусловлена наличием оборудования, работающего под давлением, а также наличием легковоспламеняющихся жидкостей.

Общие меры по обеспечению пожаровзрывобезопасности и устранению возможных источников пожаров и взрывов следующие [51]:

- запрещается держать ЛВЖ и горючие вещества вблизи открытого огня, в теплом месте или вблизи нагревательных приборов; хранить ЛВЖ в тонкостенной посуде с плотно закрытой пробкой;
- при проливе значительного количества легковоспламеняющихся жидкостей в лаборатории необходимо погасить все источники открытого пламени, отключить все электронагревательные приборы, открыть окна и собирать пролитую жидкость тряпкой или полотенцем;
- при возникновении пожара необходимо отключить электрическое оборудование во всей лаборатории;
- обязательным является наличие противопожарных средств в лаборатории: огнетушитель, песок, асбестовое одеяло или плотная стеклоткань; автоматических средств сигнализации;
- средства пожаротушения необходимо размещать на видном и доступном месте;
- работники, принимающие участие в ликвидации аварий должны использовать индивидуальные средства защиты: перчатки, резиновую обувь, противогазы.
- при возгорании одежды на человеке, тушить асбестовым одеялом. Горящую поверхность тушить песком, огнетушителем (пенным, углекислотным).
- в случае пожара эвакуация людей проводится согласно плану эвакуации.

6.4.2 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Одним из важнейших факторов в безопасности жизнедеятельности людей является подготовленность к чрезвычайным ситуациям. Чрезвычайные ситуации можно квалифицировать следующим образом [52]:

1. ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду);

2. ЧС, связанная со стихийными бедствиями (землетрясения, наводнения, ураганы, смерчи, снежные бури, заносы, оползни, обвалы, эпидемии, лесные и торфяные пожары).

В случае возгорания, возникновения пожара или взрыва необходимо немедленно прекратить работы в помещении и принять меры по устранению чрезвычайной ситуации. По возможности необходимо обесточить все оборудование в лаборатории при помощи общего рубильника. В случае если пожар не распространился по помещению, необходимо использовать огнетушитель, для своевременного тушения загоревшегося оборудования или участка электросети. При необходимости нужно обеспечить эвакуацию людей в безопасное место, а также использовать кнопку пожарной сигнализации. Также в лаборатории находится аптечка с медикаментами для оказания пострадавшим первой медицинской помощи.

Возможно возникновение пожаров, взрывов, разрушение зданий в результате разрядов атмосферного электричества, ураганов, землетрясений. Здание защищаются от прямых ударов молнии молниеприемниками, воспринимающими разряд на себя, заземлителями, служащими для отвода тока в землю и токопроводами, соединяющими молниеприемники и заземлители. Для обеспечения безопасности людей рекомендуется ограждать заземлители или во время грозы не допускать людей к заземлителям на расстояние ближе 5-6 метров. Заземлители располагаются вдали от дорог. В случае стихийного бедствия (урагана, землетрясения) необходимо отключить воду, электричество и покинуть помещение согласно плану эвакуации [52].

Заключение

В ходе исследования был проведен анализ литературы по изучению скаффолдов, материалов для их изготовления, а также технологий работы с клеточными культурами. Экспериментальная часть включала исследование цитотоксичности и биосовместимости исходных и модифицированных скаффолдов на основе полимеров PCL, PNB, PNB+rGO.

Для оценки биоматериалов на цитотоксичность на эмбриональных фибробластах мыши линии 3T3-L1 использовались колориметрические методы (резазуриновый и МТТ тесты).

В процессе исследования был разработан оптимизированный протокол окрашивания флуоресцентными красителями клеток для визуализации их роста на поверхности 3D-скаффолдов.

Оценка пролиферации клеток на различных скаффолдах показала, что оптимальной для роста клеток поверхностью обладает полимер PNB модифицированный восстановленным оксидом графена. Рост клеток на модифицированных скаффолдах почти в 11 раз выше, чем на немодифицированных полимерах.

Данный эффект предположительно связан с изменением поверхности скаффолдов. Более высокая гидрофильность и шероховатость модифицированного материала облегчает прикрепление и способствует росту клеток на нем.

Была проведена оценка конкурентоспособности технических решений, а также составлен график проведения научного исследования. Исходя из полученных расчетов в разделе «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение», данное исследование соответствует современным требованиям финансовой и ресурсной эффективности.

Проведен анализ опасных и вредных факторов при разработке и эксплуатации проектированного решения. Вопросы безопасности были

рассмотрены в соответствии с нормативными документами ГОСТ и СанПиН. Произведен расчет вредного фактора – недостаточной освещенности. Подсчитано, что освещенность соответствует санитарным нормам. Исследование проведено с учетом требований безопасности, предъявляемых инженеру со стороны социальной ответственности.

По результатам исследований сделаны следующие выводы:

- Получены полимерные скаффолды PCL, PNB и PNB (+ reduced graphene oxide) методом электроспиннинга;
- Установлено отсутствие токсического действия материалов PCL, PNB и PNB+rGO в эксперименте In vitro;
- Изучена биосовместимость скаффолдов, изготовленных из PCL, PNB и PNB+rGO на клеточных культурах, показана более высокая пролиферативная активность клеток на модифицированном скаффолде PNB+rGO;
- Разработан протокол фиксации и окраски клеток на 3D каркасах с использованием флуоресцентных красителей.

Список публикаций

1. Хан Е. А. Влияние модификации поверхности полимерных скэффолдов на их адгезивное свойство // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых , Томск, 17-21 Мая 2021. - Томск: ТПУ, 2021 - С. 372-373;
2. Хан Е. А., Плотников Е.В., Сурменева М.А., Сурменев Р. А. Оценка свойства биосовместимости полимерных скэффолдов на основе клеточных технологий // Сборник трудов международной конференции по науке и технологиям «Россия-Корея-СНГ», Москва, 19–21 октября 2020 г. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2020. – С. 65-69;
3. Хан Е. А. Оценка биосовместимости скэффолдов с использованием эмбриональных фибробластов // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых , Томск, 21-24 Сентября 2020. - Томск: ТПУ, 2020 - С. 333-334.

Список использованной литературы

1. O'Brien F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Materials Today – 2011, Vol. 14(3), P.88–95;
2. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review // Internat. Jour. of Polym. Scien. – 2011, P.1–19;
3. Slutsky D. Bone Graft Substitutes / Principles and Practice of Wrist Surgery – 2010, Imprint: Saunders, P.277–288;
4. Sung H-J., Meredith C., Johnson C. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis // Biomaterials – 2004, Vol. 24. P.5735–5742;
5. Santoro M., Shah S.R., Walker J.L. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2016. Vol. 107. P. 206-212;
6. Bose S., Sarkar N. Natural Medicinal Compounds in Bone Tissue Engineering // Trends in Biotechnology – 2019, Vol. 38(4), P.404-417;
7. Koons G. L., Diba M., Mikos A. G. Materials design for bone-tissue engineering // Nature Reviews Materials – 2020, Vol. 5, P.584-603;
8. Kargozar S., Mozafari M., Hamzehlou S., Brouki Milan P., Kim H.-W., Baino F. Bone Tissue Engineering Using Human Cells: A Comprehensive Review on Recent Trends, Current Prospects, and Recommendations // Applied Sciences – 2019, Vol. 9(1), P.174;
9. Langdahl, B., Ferrari, S., & Dempster, D. W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis // Therap. Adv. in Mus.Dis. – 2016, Vol. 8(6), P.225–235;
10. Prasad A. State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering // Materials today proceedings – 2021, Vol. 44, Part 1, P.1391-1400;

11. Ribeiro C. et al. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2015. – T. 136. – P.46-55;
12. Cho S. J., Jung S. M., Kang M., Shin H. S., Youk J. H. Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP- b -PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility // *Polymer* - 2015, Vol. 69, P.95–102;
13. Sadat-Shojai M., Khorasani M.-T., Jamshidi A. A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels // *Chem. Engin. Journal* – 2016, Vol. 289, P.38–47;
14. Yang C. E. What is the piezoelectric effect? / *Electronic design*. – Sept. 2016;
15. Heywang W., Lubitz K., Wersing W. (ed.). *Piezoelectricity: evolution and future of a technology*. – Springer Science & Business Media, 2008. – P. 114;
16. Tandon B., Blaker J. J., Cartmell S. H. Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair // *Acta Biomaterialia* – 2018, Vol. 73, P.1–20;
17. Chorsi M. T., Curry E. J., Chorsi H. T., Das R., Baroody J., Nguyen T. D. Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators // *Advanced Materials* – 2018, P.1802084;
18. Allen M. J., Tung V. C., Kaner R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene // *Chemical Reviews* – 2010, Vol.110(1), P.132–145;
19. Daneshmandi L., Barajaa M., Tahmasbi Rad A., Sydlik S. A., Laurencin C. T. Graphene- Based Biomaterials for Bone Regenerative Engineering: A Comprehensive Review of the Field and Considerations Regarding Biocompatibility and Biodegradation // *Advanced Healthcare Materials* – 2020, P.2001414;
20. Pei S., Cheng H.-M. The reduction of graphene oxide // *Carbon* – 2012, Vol. 50(9), P.3210–3228;

21. Yarin A. L., Koombhongse S., Reneker D. H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers // Jour. of Appl. Phys. – 2001, Vol. 90(9), P.4836–4846;
22. Ratner B. D. The Biocompatibility of Implant Materials // Host Response to Biomaterials – 2015, P.37–51;
23. Anderson J. M. Biocompatibility // Polymer Science: A Comprehensive Reference – 2012, P.363–383;
24. Schmid-Schönbein G. W. Analysis of inflammation // Ann. Rev. of Biom. Eng. – 2006, Vol. 8(1), P.93–151;
25. Frens G., Kolloid Z. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspension // Nat. Phys. Science – 1973, Vol. 241, P.20-22;
26. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin // Cell Viability Assays – 2017, Vol. 1601, P.1–17;
27. Gerlier D., Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation // Jour. of Immun. Methods – 1986, Vol. 94(1-2), P.57–63.
28. Kuete V., Karaosmanoğlu O., Sivas H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables // Medic. Spices and Veget. from Africa – 2017, P.271–297;
29. Maines M. D. Heme Oxygenase 1 Transgenic Mice as a Model to Study Neuroprotection // Red. Cell Biol. and Gen. Part B – 2002, P.374–388;
30. Среды для культивирования клеток. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.dia-m.ru/page.php?pageid=51577> (дата обращения: 15.04.2022);
31. Azimi B., Milazzo M., Lazzeri A., Berrettini S. Electrospinning Piezoelectric Fibers for Biocompatible Devices // Advanced Healthcare Materials – 2019, P. 1901287;

32. Mandal B. B., Gil E. S., Panilaitis B., Kaplan D. L. Laminar Silk Scaffolds for Aligned Tissue Fabrication // *Macromolecular Bioscience* – 2012, Vol. 13(1), P.48–58;
33. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: 2011, с. 110;
34. McCarthy L.R. and Senne J.E. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures // *J. Clin. Microbiol* – 1980, Vol. 11, P.281-285;
35. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К. Уотсон Дж. Д. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд. перераб. М75 и доп. Т. 2.: Пер. с англ.- М.: Мир, 1993, с. 539;
36. Lichtman J. W., Conchello J.-A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods* – 2005, Vol. 2(12), P.910–919;
37. Fukada E., Ando Y. Piezoelectric properties of poly- β -hydroxybutyrate and copolymers of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1986. – Т. 8. – №. 6. – С. 361-366.
38. Risbud M.V., Bhone R. R. Polyacrylamide-Chitosan Hydrogels: In Vitro Biocompatibility and Sustained Antibiotic Release Studies // *Drug Delivery* – 2000, Vol. 7(2), P.69-75;
39. Yang X., Yang K., Wu S., Chen X. Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze–thawing // *Radiat. Phys. and Chem.* Vol. 79(5) – 2010, P. 606-611;
40. Стандартные значения критерия Стьюдента. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://kebc.papt59.host.ru/Upload/statistik/tab_st.htm (дата обращения 20.04.2021);
41. "Трудовой кодекс Российской Федерации" от 30.12.2001 N 197- ФЗ (ред. от 01.04.2019);

42. Федеральный закон от 22 июля 2008 г. N123–ФЗ Технический регламент о требованиях пожарной безопасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_148963/;
43. Технический регламент от 24 декабря 2009 г. О безопасности средств индивидуальной защиты. Утв. постановлением Правительства РФ N 1213 [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.rg.ru/2010/03/30/tehreg-site-dok.html>;
44. ГОСТ 12.0.003-15. ССБТ Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. – М.: ИПК Из-во стандартов, 2015.-4;
45. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/5200233>;
46. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания". [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573500115> ;
47. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1) .- М.: ИПК Изд-во стандартов, 1974. – 4 с.;
48. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые значения напряжений прикосновения и токов (с изменением №1). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-12-1-038-82-ssbt> ;
49. СП 52.13330.2016. Свод правил. Естественное и искусственное освещение. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456054197> ;
50. ГОСТ 17.1.3.13-86. Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к охране поверхностных вод от загрязнений. [Электронный

ресурс]. – Режим доступа:
www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=8515;

51. Федеральный закон от 22 июля 2008 г. N123–ФЗ Технический регламент о требованиях пожарной безопасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_148963/;

52. ГОСТ 22.0.07-95. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Источники техногенных чрезвычайных ситуаций. Классификация и номенклатура поражающих факторов и их параметров. – М.: Госстандарт России, 1995.

Приложение А

Раздел 3

Experimental section of preparation and biocompatibility studying of promising polymeric materials for tissue engineering

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Хан Елена Алексеевна		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Евгений Владимирович	К.Х.Н.		

Консультант – лингвист отделения иностранных языков ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОИЯ	Кобзева Надежда Александровна	К.П.Н		

3 Experimental section

3.1 Preparation of scaffolds

At the first stage, polymeric powders were dissolved in 5% chloroform. The concentration of polymers in solution was: PCL - 9% wt., PHB - 5% wt. Ultrasound was used to intensify the process. The solution was heated at 50 ° C for 2-4 hours in a hermetically sealed jar with occasional shaking of the solution by hand (every 30 minutes, and during the first hour every 15 minutes) until a homogeneous mixture was obtained.

The second stage included filling the syringe with the resulting solution. Then the apparatus for electrospinning was switched on. Upon completion of the electrospinning process, the materials were removed from the collector shaft. Then they were placed in an oven for 24 hours at a temperature of 30 °C to remove residual solvent. The output was fibrous polymer scaffolds.

The piezoelectric properties of different materials depend on the porosity of the structure. The enhancement of the piezoelectric properties with an increase in the scaffold density is explained by the better interconnection of the active piezoelectric phase.

Dispersed reduced graphene oxide in an amount of 0.7% of the dry polymer weight was used to modify PHB. Dissolution of graphene oxide occurred in chloroform using ultrasound. Next, a weighed portion of PHB was added to the solution and filled into a syringe for electrospinning.

Polymers dissolved in chloroform are shown in Figure 6.

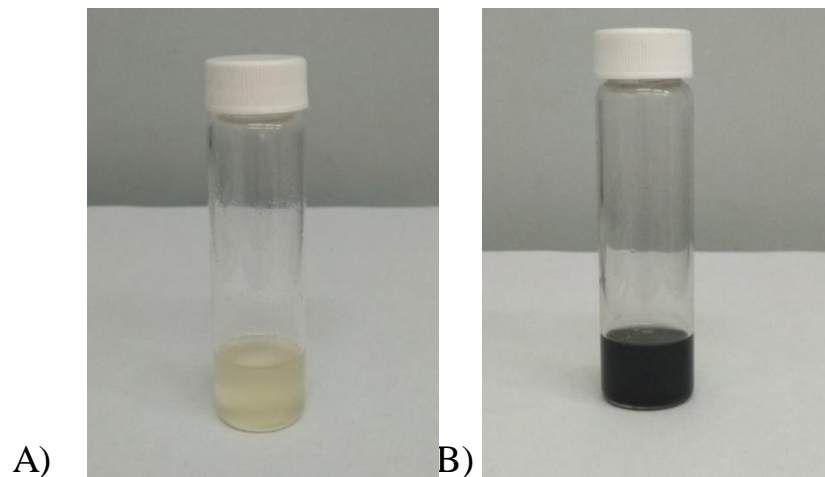


Figure 6 Solutions A) PHB and B) PHB in combination with rGO

3.2 Structure of the scaffolds

Scanning Electron Microscopy (SEM) is a tool that allows scientists to see the invisible things in micro- and nanoscales. Currently, there are two types of microscopy available to researchers: optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM). OM differs from SEM in the following properties and features:

(a) the basic principle of operation in OM is light, in contrast to SEM, the parameters of which depend on electron emission;

(b) a simple OM has only one lens, and a composite OM has two lenses. Lenses depend on the deflection of light to magnify the image;

(c) the magnification of the modern OM ranges from 400 to 1000 times the original size, which is very small numbers in compare with the magnification obtained by the SEM, that reaches 300000 times.

To determine the structure of scaffolds, we used the method of scanning electron microscopy performed on a QUANTA 200 3D system with focused electron beams (FEI Company (USA)). OM was used to detect cells on scaffolds.

3.3 Piezoelectric characteristics of polymeric biomaterials

In order to evaluate the piezoelectric properties, measurements of the piezoelectric coefficient d_{33} of the samples were carried out. In the work, the piezo-tester “YE2730A d_{33} meter” was used (Figure 7). In this equipment, a cyclic mechanical load applies force of 250 mN and a frequency of 110 Hz to scaffolds.



Figure 7 Peizo-tester “YE2730A d33 meter”

The piezoelectric potential of the surface of the obtained polymeric scaffolds was investigated on the setup developed at the Tomsk Polytechnic University, the functional diagram of which is shown in Figure 8.

The samples were placed between two electrodes. One of the electrodes is quiescently fixed, while the second, through the system motor - coupling - eccentric shaft - spring, provided a mechanical pressure with adjustable frequency. The samples were mechanically deformed at a frequency of 5, 7, and 9 Hz. The electric potential from the surface of the piezoelectric samples was processed using a repeater system with a load resistance of 1 GigaOM and was recorded with an Aktak ANR-1002 oscilloscope.

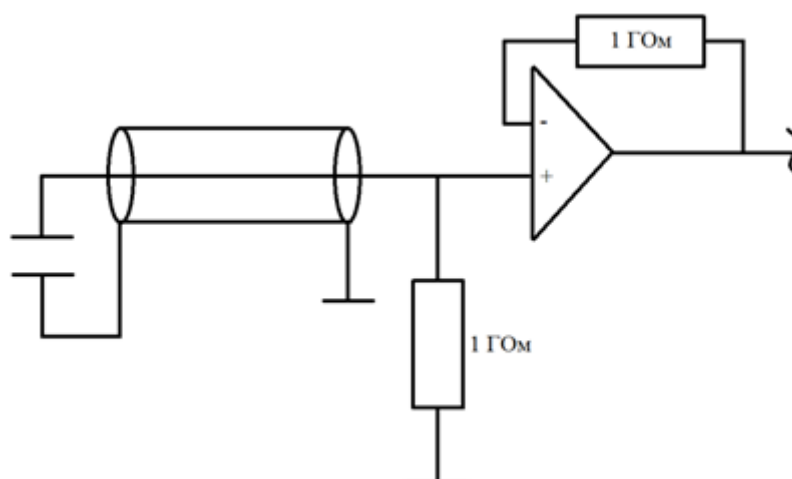


Figure 11 Functional diagram of the equipment for determining the surface potential

3.4 Wet angle analysis

The surface wettability of the scaffolds was determined by measuring the contact angle on a digital goniometer Drop Shape Analysis System - DSA100 (KRÜSS, GmbH, Germany) by the lying drop method.

A sample in the form of an 8 x 80 mm strip was placed in the field of view of the device's video camera in front of the light source. During the measurement, water was supplied to the surface of the samples from the dosing system in the form of drops with a volume of about 4 - 5 μL .



Figure 12 Drop Shape Analysis System - DSA100

3.5 Evaluation of scaffolds' toxicity using the Resazurin assay

The finished polymeric scaffolds PHB, PCL and the PHB with the addition of the graphene modification(PHB + rGO) were sterilized using 70% ethanol on a shaker for 30-40 minutes. Then each sample was individually placed in microcentrifuge tubes (Eppendorf). To obtain an extract, 0.7 ml of DMEM medium was added. Experimental tubes were placed in a thermostat for 5 days at 37 °C with CO₂ supply [31].

After 5 days, 3T3-L1 cells were thawed and dissolved in DMEM. A suspension with 10,000 3T3-L1 mouse fibroblast cells in DMEM medium was prepared by counting cells in Countless II FL. Then, 100 μl of this suspension were

added into 72 wells of an adhesive 96-well plate. The cells were left to incubate in a thermostat for 24 hours at 37 ° C with CO₂ supply.

The spent medium was removed from the wells, and the extract of scaffolds and the DMEM medium were added to the marked wells, as in Table 2. 3% hydrogen peroxide was used for negative control, while DMEM medium was a positive (living cells) control. After a day of cultivation, the dye Alamar Blue (trade name of Resazurin) was added.

After 24 hours of cultivation, the results on the cytotoxicity of polymer biomaterials were obtained using a Multiskan Go plate spectrophotometer for UV spectroscopy and spectroscopy in the visible region. The optical densities of the suspensions from Figure 13, taken at 570 nm and at 620 nm, are shown in Table 3 and 4, respectively. The data are presented taking into account the subtraction of the optical density of the 96-well plate.

Optical density at 570 nm is proportional to the number of living cells, and at 620 - to the number of dead cells.

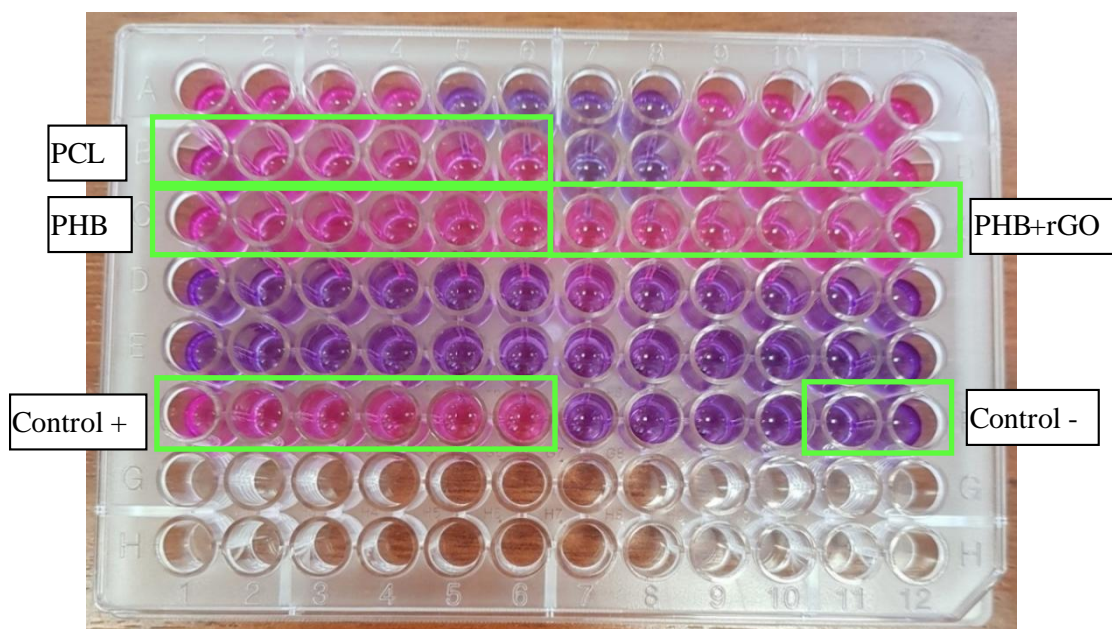


Figure 13 96-well microtiter plate with samples after staining

Table 2 - Analyzed suspensions

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	100% DMEM	80% DMEM+2 0% extract	60% DMEM+4 0% extract	40% DMEM+6 0% extract	20% DMEM+8 0% extract	100% extract						
C	100% DMEM	80% DMEM+2 0% extract	60% DMEM+4 0% extract	40% DMEM+6 0% extract	20% DMEM+8 0% extract	100% extract	100% extract	20% DMEM+8 0% extract	40% DMEM+6 0% extract	60% DMEM+4 0% extract	80% DMEM+2 0% extract	100% DMEM
F	Control +	Control+	Control+	Control+	Control +	Control+					Control-	Control-

Table 3 - Optical density of the investigated extract at a wavelength of 570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	0,7897	0,8471	0,8675	0,8896	0,8899	0,8532						
C	0,8503	0,8854	0,954	0,8930	0,8778	0,8496	0,8733	0,8464	0,8074	0,8402	0,8427	0,8642
F	0,7218	0,8014	0,8166	0,8495	0,8274	0,8348					0,5263	0,4860

Table 4 - Optical density of the investigated extract at a wavelength of 620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,07164	0,01064	0,01104	0,009642	0,01734	0,01234						
B	0,006342	0,007042	0,02304	0,01264	0,01394	0,01204	0,007642	0,007542	0,01184	0,01374	0,01164	0,01384
F	0,008642	0,008442	0,01184	0,009642	0,01094	0,01224					0,2406	0,2202

3.6 Fixation and staining of cells using dyes

To detect cell adhesion and proliferation on biomaterials, all samples were firstly sterilized in 70% ethanol on a shaker for 30-40 minutes. Each sample was taken in 5 pieces, since the counting of cells was performed after 24 hours and 72 hours, and one sample was a control.

Then the samples were transferred to Eppendorf with 1 ml of sodium phosphate buffer (PBS) to remove ethanol. Moreover, this wetting allowed the samples to be placed on the bottom of the plate well.

To prepare a suspension, 3T3-L1 cells were thawed, then transferred to Falcon tubes with DMEM. A centrifuge was used to separate dead and destroyed cells. After receiving a suspension of living cells, they were counted using a Countless II FL cell counter. Then, 100 μ l of a suspension with 10,000 cells was added to each sample and controls in 96-well plate. The plate was placed in a thermostat for one day at 37 ° C with CO₂ supply.

Vital staining was performed with a solution of 1 μ g / ml Hoechst 33342 dye, which stains the nuclei of all cells, and 1 μ g / ml of calcein (fluorexon) dye, which converts to green fluorescent calcein after hydrolysis of acetoxymethyl ether by intracellular esterases of a living cell [32].

Hoechst 33342 was added to the PBS solution with a final concentration of 5.7 μ g / ml and calcein of 2.86 μ g / ml. To quantify the number of viable cells, each sample was prepared and stained with $n = 2$ after the first 24 hours. The medium was removed from the wells with samples and controls, and the dye was added. Set to incubate for 30 minutes.

Experiments were also carried out with different combinations of dyes.

Propidium iodide (PI) - is impermeable to the cell membrane and stains only the nucleic acids of apoptotic or necrotic cells. The maximum emission is observed at 617 nm [33].

Acridine orange interacts differently with single-stranded and double-stranded RNA and DNA molecules. As a result of staining, double-stranded nucleic

acid molecules fluoresce in green light, and single-stranded ones in red. Binding of acridine orange to nucleic acid occurs in both living and dead cells. The maximum emission occurs at 525 nm (green) and 650 nm (red) [34].

The phalloidin molecule is capable of selectively binding to polymerized fibrillar actin, which is an essential component of the cellular cytoskeleton. Since it does not dissolve in water, it must be dissolved in methanol. When it used on cells, it should be left in the open air to allow methanol to evaporate completely, which can affect the color quality. Fixation is carried out in formaldehyde, which is prepared by diluting paraformaldehyde (polymerized formaldehyde) in a buffer. The duration of fixation in formaldehyde depends on the characteristics of the object being fixed and is usually from 15 minutes for individual cells to a one day for large, poorly permeable tissues. 583 nm is the maximum radiation [35].

3.7 Fluorescence microscopy

Microscopes are instruments designed to produce magnified visual or photographic images of small objects. The microscope has three tasks: to create an enlarged image of the sample, to separate the details in the image, and to visualize the details visible to the human eye or camera. Fluorescence microscopy allows scientists to see the structure of the cell, its growth and proliferation.

Emission of light during fluorescence occurs almost simultaneously with absorption of excitation light due to the relatively short time lag between absorption and emission of a photon, usually less than a microsecond. When radiation persists after the excitation light is extinguished, this phenomenon is called phosphorescence [36].

The results of cell growth were obtained using an inverted microscope Axio Vert.A1 Carl Zeiss, shown in Figure 14. The samples were examined in bright and dark fields. Hoechst 33342 dye has maximum fluorescence emission at 461 nm and Calcein at 517 nm. Therefore, filters GFP 470 nm and DAPI 385 nm were installed for shooting, the objective was used with a magnification of 10 and 20 times. An LED lamp acts as a source of light excitation.

Optical microscopy revealed graphene inclusions in the composition of PHB.



Figure 14 Microscope Axio Vert.A1 Carl Zeiss